



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.05.14**

**(21)** Номер заявки  
**201791005**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.11.06**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

**(54) УЛУЧШЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ IL-6**

**(31)** **62/077,105; 62/087,448; 62/247,705**

**(32)** **2014.11.07; 2014.12.04; 2015.10.28**

**(33)** **US**

**(43)** **2017.09.29**

**(86)** **PCT/US2015/059532**

**(87)** **WO 2016/073890 2016.05.12**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕСЕН БАЙО, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Шмидт Майкл Марч, Тисдэйл  
Элисон, Ферфайн Эрик Стивен,  
Зарбис-Папастойтсис Григориос (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** **WO-A1-2014074905  
WO-A1-2007076927  
WO-A2-2008144763**

KALAI M. ET AL.: "Analysis of the mechanism of action of anti-human interleukin-6 and anti-human interleukin-6 receptor-neutralising monoclonal antibodies", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 249, no. 3, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 690-700, XP002551736, ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1111/J.1432-1033.1997.T01-2-00690.X page 691, left-hand column, paragraph 3 page 691, left-hand column, paragraph 5 - paragraph 6 page 692, right-hand column, paragraph 3 - page 694, right-hand column, paragraph 2 page 698, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1

DONNA K. FINCH ET AL.: "Whole-Molecule Antibody Engineering: Generation of a High-Affinity Anti-IL-6 Antibody with Extended Pharmacokinetics", JOURNAL OF

MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 411, no. 4, 16 June 2011 (2011-06-16), pages 791-807, XP028259790, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2011.06.031 [retrieved on 2011-06-23] the whole document

US-B1-6277375

WO-A2-2004045507

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document

WINKLER K. ET AL.: "Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 165, no. 8, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 4505-4514, XP002579393, ISSN: 0022-1767 the whole document

CHIEN N.C. ET AL.: "Significant structural and functional change of an antigen-binding site by a distant amino acid substitution: Proposal of a structural mechanism", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 86, no. 14, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 5532-5536, XP009187738, ISSN: 0027-8424 the whole document

PANKA D.J. ET AL.: "Defining the structural correlates responsible for loss of arsonate affinity in an Id<CR> antibody isolated from an autoimmune mouse", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 30, no. 11, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 1013-1020, XP023969623, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(93)90126-V [retrieved on 1993-08-01] the whole document

**(57)** Предлагаются улучшенные антитела против IL-6. Описываются применения этих антител при лечении заболеваний, связанных с IL-6, например глазных заболеваний, таких как диабетический макулярный отек.

### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет временной заявки на патент США № 62/077105, поданной 7 ноября 2014 г.; временной заявки на патент США № 62/087448, поданной 4 декабря 2014 г.; и временной заявки на патент США № 62/247705, поданной 28 октября 2015 г. Полное содержание каждой из этих заявок включается в настоящий документ в качестве ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Область настоящего изобретения относится к IL-6. Более конкретно, эта область относится к модуляторам IL-6 и к их применениям при лечении заболеваний, таких как заболевания глаз.

### Уровень техники

IL-6 представляет собой плеiotропный цитокин с известной ролью при воспалении, гематопозе, ангиогенезе, дифференциации клеток и выживаемости нейронов. Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам против IL-6 и к их применениям.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам против IL-6 и к их фрагментам (например, антигенсвязывающим фрагментам) или к их производным, а также к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела против IL-6 и их фрагменты. Настоящее изобретение также относится к применениям таких антител, фрагментов или производных. Антитела и их фрагменты или производные могут использоваться, например, при лечении заболевания, ассоциированного с IL-6. В некоторых вариантах осуществления антитело, его фрагмент или производное может связываться (например, специфично связываться) с IL-6, например с IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, его фрагмент или производное может связываться (например, специфично связываться) с сайтом II IL-6 (например, с сайтом II IL-6 человека).

В одном из аспектов в настоящем документе предлагается выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариabельную область тяжелой цепи, содержащую:

- (i) CDR1 VH, содержащую последовательность GYX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>NYLIE (SEQ ID NO: 45),
- (ii) CDR2 VH, содержащую последовательность VX<sub>3</sub>TPGX<sub>4</sub>GTIN (SEQ ID NO: 46), и
- (iii) CDR3 VH,

где верным является одно или несколько из следующих утверждений (например, 1, 2, 3 или все они): X<sub>1</sub> не представляет собой A, X<sub>2</sub> не представляет собой S, X<sub>3</sub> не представляет собой I и X<sub>4</sub> не представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> не представляет собой A, X<sub>2</sub> не представляет собой S, X<sub>3</sub> не представляет собой I и X<sub>4</sub> не представляет собой S.

В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> представляет собой V или консервативное замещение для V. В некоторых вариантах осуществления X<sub>2</sub> представляет собой P или консервативное замещение для P. В некоторых вариантах осуществления X<sub>3</sub> представляет собой T или консервативное замещение для T. В некоторых вариантах осуществления X<sub>4</sub> представляет собой G или консервативное замещение для G.

В некоторых вариантах осуществления верным являются одно, два, три из следующих утверждений или все они: X<sub>1</sub> представляет собой V или консервативное замещение для V, X<sub>2</sub> представляет собой P или консервативное замещение для P, X<sub>3</sub> представляет собой T или консервативное замещение для T и X<sub>4</sub> представляет собой G или консервативное замещение для G. В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> представляет собой V или консервативное замещение для V, X<sub>2</sub> представляет собой P или консервативное замещение для P, X<sub>3</sub> представляет собой T или консервативное замещение для T, и X<sub>4</sub> представляет собой G или консервативное замещение для G.

В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> выбран из V, I, L и M. В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> выбран из V, I и L. В некоторых вариантах осуществления X<sub>2</sub> выбран из P, G и A. В некоторых вариантах осуществления X<sub>2</sub> выбран из P и G. В некоторых вариантах осуществления X<sub>3</sub> выбран из T и S. В некоторых вариантах осуществления X<sub>4</sub> выбран из G и P.

В некоторых вариантах осуществления верным является одно или несколько из следующих утверждений (например, 1, 2, 3 из них или все они): X<sub>1</sub> представляет собой V, X<sub>2</sub> представляет собой P, X<sub>3</sub> представляет собой T, и X<sub>4</sub> представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления X<sub>1</sub> представляет собой V, X<sub>2</sub> представляет собой P, X<sub>3</sub> представляет собой T и X<sub>4</sub> представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления CDR3 VH содержит последовательность SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом (например, с идентичным в остальном антителом или антигенсвязывающим фрагментом), содержащим последовательность, где верным является одно или несколько из следующих утверждений (например, 1, 2, 3 из них или все они): X<sub>1</sub> представляет собой A, X<sub>2</sub> представляет собой S, X<sub>3</sub> представляет собой I и X<sub>4</sub> представляет собой S.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 31, CDR2 VH, содержащую по-

следовательность SEQ ID NO: 32, и необязательно, CDR3 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи состоит из последовательности, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 17 или отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи отличается на 1-5 аминокислот от SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи состоит из последовательности, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность scFv или состоит из нее

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTPGGGTIN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPFLYYYALEYWGQGTITVTVSSG  
 GGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWIYQKPKGQPPKLLIYAASNRGSGV  
 PDRFSGSGSDTFTLTISLQAEDVAVYYCQOSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV  
 (SEQ ID NO:52) или

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWIYQKPKGQPPKLLIYAASNRG  
 SGVDPDRFSGSGSDTFTLTISLQAEDVAVYYCQOSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGG  
 SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTPGGGTIN  
 NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPFLYYYALEYWGQGTITVTVSS  
 (SEQ ID NO:53) .

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. В

некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с EBI-029 или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR1 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, с CDR2 VH, содержащей последовательность SEQ ID NO: 5, и необязательно, с CDR3 VH, содержащей последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 17 или состоящей из него. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11 или состоящую из нее.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько последовательностей EBI-030 или EBI-031, как приведено в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит один или несколько доменов EBI-030 или EBI-031, как показано на фиг. 15 (например, один или несколько доменов из FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, шарнира, CH2 и CH3 последовательности тяжелой цепи и/или FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 и СК последовательности легкой цепи). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи связаны одной или несколькими дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv или фрагмент Fv.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим одну или несколько соответствующих последовательностей EBI-029 или последовательностей антитела, описанного в WO 2014/074905, включаемой в качестве ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с тоцилизумабом.

Таблица 4

Итоговый обзор последовательностей EBI-029, EBI-030 и EBI-031

Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
Последовательность aa HC EBI-029 (IgG2)	SEQ ID NO: 11	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCRASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDP <del>LY</del> YYALE YWGQGT <del>TT</del> TVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTCNV <del>D</del> HK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS <del>VL</del> TVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK <del>T</del> KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYK <del>TT</del> PPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALH <del>NH</del> YTQK SLSLSPGK

HC EBI-029 H311A	SEQ ID NO:10	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVROA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AOKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGT <del>T</del> TVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV <del>D</del> HK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS <del>V</del> LT <del>V</del> V AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK <del>T</del> KGQPREPQVY TLPSSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQ <del>P</del> EN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Последовательно сть aa EBI-029 LC	SEQ ID NO:12	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMN <del>W</del> Y QQKPGQPPKL LIYAASN <del>R</del> GS GVPDRFSGSG SGTDF <del>T</del> LTIS SLQAEDVAVY YCQOSEEV <del>P</del> LTFGQGT <del>K</del> LEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASV <del>V</del> CLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL <del>S</del> STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
Последовательно сть aa Fab HC EBI-029 (IgG1)	SEQ ID NO:24	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVROA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AOKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR <del>S</del> R <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGT <del>T</del> TVV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDK <del>V</del> EPKSCDKTHT
Последовательно сть aa VH EBI-029	SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALS <del>N</del> Y <del>L</del> I <del>E</del> W <del>V</del> R <del>O</del> A WVRQAPGQGLEWMGVITP <del>G</del> S <del>G</del> T <del>I</del> N <del>Y</del> AQ <del>K</del> F <del>Q</del> G <del>R</del> V <del>T</del> I <del>T</del> ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <del>S</del> R <del>W</del> D <del>P</del> L <del>Y</del> Y <del>A</del> L <del>E</del> WGQGT <del>T</del> TV <del>V</del> SS
Последовательно сть aa VL EBI-029	SEQ ID NO:18	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN <del>W</del> Y <del>Q</del> KPGQPKLLIYAASN <del>R</del> GS <del>G</del> V <del>P</del> DRFSGSGSGTDF <del>T</del> LTIS <del>S</del> LQAE DVAVYYCQOSEEV <del>P</del> LTFGQGT <del>K</del> LEIKRTV
CDR1 HC EBI - 029	SEQ ID NO:4	GYALS <del>N</del> Y <del>L</del> I <del>E</del>
CDR2 HC EBI-029	SEQ ID NO:5	VITP <del>G</del> S <del>G</del> T <del>I</del> N
CDR3 HC EBI-029	SEQ ID NO:6	SRWD <del>P</del> L <del>Y</del> Y <del>A</del> L <del>E</del> Y
CDR1 LC EBI-029	SEQ ID NO:7	RASESVDNYGIPFMN
CDR2 LC EBI-029	SEQ ID NO:8	AASN <del>R</del> GS
CDR3 LC EBI-029	SEQ ID NO:9	QQSEEV <del>P</del> L <del>T</del>
Последовательно сть aa HC EBI-030 (IgG2)	SEQ ID NO:41	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYV <del>L</del> P NYLIEWVROA PGQGLEWMGV <del>T</del> TPGG <del>G</del> T <del>I</del> N <del>Y</del> AOKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR <del>S</del> R <del>W</del> D <del>P</del> L <del>Y</del> Y <del>A</del> L <del>E</del> YWGQGT <del>T</del> TVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV <del>D</del> HK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS <del>V</del> LT <del>V</del> V HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK <del>T</del> KGQPREPQVY TLPSSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQ <del>P</del> EN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Последовательно сть aa LC EBI-030	SEQ ID NO:42	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMN <del>W</del> Y QQKPGQPPKL LIYAASN <del>R</del> GS GVPDRFSGSG SGTDF <del>T</del> LTIS SLQAEDVAVY YCQOSEEV <del>P</del> LTFGQGT <del>K</del> LEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASV <del>V</del> CLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL <del>S</del> STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

Последовательность aa Fab HC EBI-030 (IgG1)	SEQ ID NO:39	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTIN Y AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FFLAPSSKST SGTAAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT
Последовательность aa Fab HC EBI-030 (IgG2)	SEQ ID NO:54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWM GVTTTPGGGTIN Y AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARSRWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSV FFLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERK
Последовательность aa VH EBI-030	SEQ ID NO:37	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTIN Y AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SS
Последовательность aa VL EBI-030	SEQ ID NO:38	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN WYQQKPGQPP KLLIY AASNRGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQSEEVPLT FG QGTKLEIKRTV
EBI-030 CDR1 HC	SEQ ID NO:31	GYVLP NYLIE
EBI-030 CDR2 HC	SEQ ID NO:32	VTTTPGGGTIN
CDR3 HC EBI-030-	SEQ ID NO:33	SRWDPLYYYALEY
CDR1 LC EBI-030	SEQ ID NO:34	RASESVDNYGIPFMN
CDR2 LC EBI-030	SEQ ID NO:35	AASNRGS
EBI-030 CDR3 LC	SEQ ID NO:36	QQSEEVPLT
Последовательность aa HC IgG2 I-031	SEQ ID NO:47	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTIN Y AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FFLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVNHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPFVAGPS VFLFPPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDV SHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS VLT VV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK T KGPQREPQVY TLPSSREEMT KNQVSLTCLV KGFYP S DIAV EWESNGQ PEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Последовательность aa VH-VL scFv	SEQ ID NO:52	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWM GVTTTPGGGTIN Y AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARSRWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSP PDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN WYQQKPGQPPKLLIYAA SNRSGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFG QGTKLEIKRTV
Последовательность aa VL-VH scFv	SEQ ID NO:53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN WYQQKPGQPP KLLIY AASNRGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQSE EVPLT FGGTKLEIKRTVGGGGSGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPG SSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTTPGGGTIN Y AQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEY WGQGTITVTVSS

aa=аминокислота; па=нуклеиновая кислота; HC=тяжелая цепь; LC=легкая цепь;  
VH=варибельная область тяжелой цепи; VL=варибельная область легкой цепи

Повышенное средство и/или улучшенная эффективность могут оцениваться с использованием способов, описанных в настоящем документе, и/или способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления средство оценивается с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления средство повышается по меньшей мере в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 или 4 раза.

В некоторых вариантах осуществления эффективность улучшена. В некоторых вариантах осуществления эффективность улучшена, как показано понижением IC<sub>50</sub> и/или понижением IC<sub>90</sub>. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> понижается по меньшей мере в 5, 10, 20, 30, 40 или 50 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> понижается по меньшей мере примерно в 50 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>90</sub> понижается по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>90</sub> понижается по меньшей мере примерно в 100 раз.

В некоторых вариантах осуществления эффективность оценивается, например, с помощью анализа с использованием НЕК-Blue™ или анализа пролиферации T1165.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов цис-IL-6, например, как оценивается на основе значения IC<sub>50</sub> или IC<sub>90</sub>, полученного с помощью анализа с использованием НЕК-Blue™, описанного в настоящем документе, например с ис-

пользованием 20 пМ свободного IL-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет  $IC_{50}$  меньше чем 47 пМ и/или  $IC_{90}$  меньше чем 4350 пМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  меньше чем 47 пМ, например меньше чем 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 пМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{90}$  меньше чем 4350 пМ, например меньше чем 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 пМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  и/или  $IC_{90}$  получаются, как оценивается при анализе с использованием НЕК-Blue™ с 20 пМ IL-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокирует свободный IL-6 с более лучшей эффективностью по сравнению с тоцилизумабом, например, как оценивается на основе значений  $IC_{50}$ , полученных с помощью анализа с использованием НЕК-Blue™ с 20 пМ IL-6. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует IL-6 с эффективностью в 900 раз более лучшей по сравнению с тоцилизумабом. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой EBI-031 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет  $IC_{50}$  меньше чем 15 пМ, например  $IC_{50}$ , равное 14,2 пМ, при ингибировании IL-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокирует передачу сигналов транс-IL-6, например, как оценивается с помощью анализа с использованием НЕК-Blue™, описанного в настоящем документе, например с 200 пМ гипер IL-6. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов с помощью гипер IL-6. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов с помощью гипер IL-6 с более лучшей эффективностью, чем тоцилизумаб, например с эффективностью в 900 раз более лучшей по сравнению с тоцилизумабом. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов с помощью гипер IL-6 с  $IC_{50}$  меньшей чем 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов с помощью гипер IL-6 с  $IC_{50}$  меньшей чем 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов с помощью гипер IL-6 с  $IC_{50}$  меньшей чем 100 пМ или меньшей чем 50 пМ, например с  $IC_{50}$  примерно 14-15 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой EBI-031 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует передачу сигналов цис-IL-6 и передачу сигналов транс-IL-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является эффективным при блокировке передачи сигналов IL-6 в глазу в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев, например, после введения в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокирует на 95% передачу сигналов IL-6 в глазу в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев, например, после введения в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокирует на 95% передачу сигналов IL-6 в глазу в течение примерно 150 дней.

В другом аспекте в настоящем документе предлагается выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность варибельной области тяжелой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 37, где указанная последовательность тяжелой цепи содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из V28, P30, T51 и G55 (нумерация аминокислот осуществляется в соответствии с SEQ ID NO: 41).

В другом аспекте в настоящем документе предлагается выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 39, где указанная последовательность содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из V28, P30, T51 и G55 (нумерация аминокислот осуществляется в соответствии с SEQ ID NO: 41).

В другом аспекте в настоящем документе предлагается выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 54, где указанная последовательность содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из V28, P30, T51 и G55 (нумерация аминокислот осуществляется в соответствии с SEQ ID NO: 41).

В настоящем документе также предлагается выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность тяжелой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 41, где указанная последовательность тяжелой цепи содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из V28, P30, T51 и G55 (нумерация аминокислот осуществляется в соответствии с SEQ ID NO: 41).

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют повы-

шенное сродство к IL-6 человека по сравнению с контрольным антителом, например по сравнению с EBI-029 или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное сродство к IL-6 человека по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который в остальном является идентичным, за исключением того, что он не содержит указанных одной или несколько аминокислот, выбранных из V28, P30, T51, и G55, а вместо этого содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из A28, S30, I51 и S55. В некоторых вариантах осуществления сродство повышается по меньшей мере в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 или 4 раза. В некоторых вариантах осуществления сродство оценивается с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет улучшенную эффективность по сравнению с контрольным антителом, например по сравнению с EBI-029 или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который в остальном является идентичным, за исключением того, что он не содержит указанных одной или нескольких аминокислот, выбранных из V28, P30, T51 и G55, а вместо этого содержит одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислот, выбранных из A28, S30, I51 и S55.

В некоторых вариантах осуществления эффективность улучшена, как показано уменьшением IC<sub>50</sub> и/или уменьшением IC<sub>90</sub>. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> уменьшается по меньшей мере в 5, 10, 20, 30, 40 или 50 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> уменьшается по меньшей мере примерно в 50 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>90</sub> уменьшается по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500 раз. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>90</sub> уменьшается по меньшей мере примерно в 100 раз.

В некоторых вариантах осуществления эффективность оценивается с помощью анализа с использованием НЕК-Blue™ или анализа пролиферации T1165.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет IC<sub>50</sub> меньше чем 47 пМ и/или IC<sub>90</sub> меньше чем 4350 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> меньше чем 47 пМ, например меньше чем 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 пМ. В некоторых вариантах осуществления, IC<sub>90</sub> меньше чем 4350 пМ, например меньше чем 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC<sub>50</sub> и/или IC<sub>90</sub> оценивается при анализе с использованием НЕК-Blue™ с 20 пМ IL-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит V28, P30, T51 и G55, и антитело или антигенсвязывающий фрагмент показывает улучшенное сродство к IL-6 человека и/или улучшенную эффективность по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который в остальном является идентичным, за исключением того, что он содержит A28, S30, I51 и S55.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи или ее антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 VL содержит последовательность SEQ ID NO: 34, CDR2 VL содержит последовательность SEQ ID NO: 35 и CDR3 VL содержит последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 38 или которая отличается от SEQ ID NO: 38 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи состоит из SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность легкой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность легкой цепи, которая отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42, или последовательность,

которая отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления последовательность легкой цепи состоит из SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 31, CDR2 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR3 VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и

(ii) CDR1 VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, CDR2 VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и CDR3 VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит указанные выше CDR за исключением того, что он содержит мутацию, например, в целом самое большее 1, 2 или 3 мутации во всех шести CDR. В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) не уменьшает сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1 или IgG2 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab IgG1 или Fab IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG2 или антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с помощью генной инженерии для уменьшения или устранения активности ADCC.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное моноклональное антитело или моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37 или состоящую из нее, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38 или состоящую из нее. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит указанные выше вариабельные области тяжелых и легких цепей за исключением того, что он имеет мутацию, например, в целом, самое большее 1, 2 или 3 мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) не уменьшает сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41, и, необязательно, последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 41, и, необязательно, последовательность легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47, и, необязательно, последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 41, и последовательность легкой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 42, за исключением того, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит мутации (например, всего 1, 2, 3, 4 или 5 мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 41 и/или SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) находится в каркасной области (областях). В некоторых вариантах осуществления мутации не уменьшают сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который не содержит указанной мутации.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 47, и последовательность легкой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 42, за исключением того, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию (например, всего 1, 2, 3, 4 или 5 мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 47 и/или SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) находится в каркасной области (областях). В некоторых вариантах осуществления мутация не уменьшает сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который не содержит указанной мутации.

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab IgG1.

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой выделенный Fab, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, и последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42. В одном из вариантов осуществления ан-

титело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой выделенный Fab, содержащий последовательность тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 39, и последовательность легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 42.

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab IgG2.

В одном из вариантов осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой выделенный Fab, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 54, и последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42. В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой выделенный Fab, содержащий последовательность тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 54, и последовательность легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 39, и последовательность легкой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 42, за исключением того, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию (например, всего 1, 2, 3, 4 или 5 мутаций, по сравнению с SEQ ID NO: 39 и/или SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) находится в каркасной области (областях). В некоторых вариантах осуществления мутация не уменьшает сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который не содержит указанной мутации.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 54, и последовательность легкой цепи, которая является идентичной SEQ ID NO: 42, за исключением того, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию (например, всего 1, 2, 3, 4 или 5 мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 54 и/или SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) находится в каркасной области (областях). В некоторых вариантах осуществления мутация не уменьшает сродство и/или эффективность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который не содержит указанной мутации.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться по меньшей мере с одним из R24, K27, Y31, D34, S118 или V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться по меньшей мере с 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере с 5 из R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться (например, может специфично связываться) с сайтом II IL-6 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с IL-6 при  $T_m$  70°C или выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с IL-6 при  $T_m$  80°C или выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент (например, его антигенсвязывающий фрагмент) связывается по меньшей мере с одним из R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с двумя из R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с тремя из R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с четырьмя R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с пятью R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается R24, K27, Y31, D34, S118 и V121 IL-6 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует агрегацию <10% при концентрации 100-150 мг/мл, например при концентрации примерно 142 мг/мл в PBS, pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с другим терапевтическим агентом, например по сравнению с тоцилизумабом, бевацизумабом, ранибизумабом и/или Eylea®. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет улучшенное удержание в глазу при

введении его в глаз, например в стекловидное тело, например, посредством инъекции в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления улучшенное удержание в глазу показывается с помощью увеличения времени полужизни в глазу, например в стекловидном теле, сетчатке, внутриглазной жидкости, сосудистой оболочке глаза и/или склере.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет время полужизни в стекловидном теле по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в стекловидном теле составляет по меньшей мере 10 дней. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в стекловидном теле оценивается на животном, например на кролике или на обезьяне. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в стекловидном теле оценивается на человеке.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, имеет уменьшенное системное время полужизни (например, пониженное  $T_{1/2\beta}$ ) и/или улучшенное системное выведение, например уменьшенное системное время полужизни или более быстрое системное выведение по сравнению с другим терапевтическим агентом, например тоцилизумабом, бевацизумабом, ранибизумабом и/или афиберцептом (Eylea®). В некоторых вариантах осуществления системное время полужизни (например,  $T_{1/2\beta}$ ) меньше, чем у тоцилизумаба и/или афиберцепта (Eylea®). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домен Fc, содержащий мутацию (например, при 1, 2, 3 или 4 мутации) в одном или нескольких положениях, соответствующих H311, D313, I254 или H436 (нумерация как в SEQ ID NO: 41). В некоторых вариантах осуществления мутация выбрана из одного или нескольких H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R и H436A. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домен Fc, содержащий мутацию, соответствующую H311A (нумерация как в SEQ ID NO: 41). В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG2.

В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG1 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 50, и необязательно содержит мутацию в одном или нескольких из подчеркнутых положений (H90, D92, I33 и H215):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG1 содержит мутацию, соответствующую одному или нескольким положениям H90A, H90E, H90N, D92T, I33A, I33R, и H215A (нумерация в соответствии с SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG2 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 51 и необязательно содержащий мутацию в одном или нескольких подчеркнутых положениях (H86, D88, I29 и H211):

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ

VYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV

VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51).

В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG2 содержит мутацию, соответствующую одному или нескольким положениям H86A, H86E, H86N, D88T, I29A, I29R и H211A (нумерация в соответствии с SEQ ID NO: 51).

В некоторых вариантах осуществления мутация Fc уменьшает системную аккумуляцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, увеличивает выведение или уменьшает время полужизни, например  $T_{1/2\beta}$ ) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления системная аккумуляция уменьшается по сравнению с другим терапевтическим агентом (например, тоцилизумабом, бевацизумабом, ранибизумабом и/или афиберцептом). В некоторых вариантах осуществления системная аккумуляция уменьшается по сравнению с тоцилизумабом и/или афиберцептом. В некоторых вариантах осуществления системная аккумуляция уменьшается по сравнению с системной аккумуляцией соответствующего антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который не содержит мутации. В некоторых вариантах осуществления системная аккумуляция оценивается после введения в стекловидное тело антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В другом аспекте в настоящем документе предлагается способ уменьшения системных воздействий ингибирования IL-6 у субъекта, способ включает введение субъекту антитела или его фрагмента, содержащего мутировавший домен Fc, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать активность IL-6 и имеет

уменьшенную активность Fc (например, уменьшенное связывание с FcRn) по сравнению с соответствующим антителом или его фрагментом, имеющим домен Fc дикого типа. В некоторых случаях способ уменьшения системных воздействий ингибирования IL-6 у субъекта включает введение субъекту антагониста IL-6, который содержит мутировавший домен Fc, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем документе предлагается нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность аминокислот, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность, описанную в табл. 4.

В настоящем документе также предлагается вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. В настоящем документе также предлагается клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор.

В некоторых вариантах осуществления антитело против IL-6 или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, предназначен для использования при лечении субъекта (например, человека) с заболеванием, ассоциированным с IL-6. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой глазное заболевание, например глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6, например, в стекловидном теле.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предназначен для использования при лечении субъекта (например, человека) с диабетическим макулярным отеком (DME), диабетической ретинопатией, увеитом, глаукомой, сухим глазом (например, с болезнью сухого глаза или синдромом сухого глаза), аллергическим конъюнктивитом, глазной болью, регматогенной отслойкой сетчатки (RRD), возрастной макулярной дистрофией (AMD), пролиферативной диабетической ретинопатией (PDR), окклюзией вены сетчатки (RVO), нейромиелитом зрительного нерва (NMO), трансплантацией роговицы, эрозией роговицы или механической травмой глаза. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предназначен для использования при лечении субъекта (например, человека) с DME.

В некоторых вариантах осуществления антитело IL-6 или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, предназначен для использования при приготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания, ассоциированного с IL-6. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой глазное заболевание, например глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6 в стекловидном теле. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек (DME), диабетическую ретинопатию, увеит, сухой глаз (например, болезнь сухого глаза или синдром сухого глаза), возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), регматогенную отслойку сетчатки (RRD), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелит зрительного нерва (NMO), трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза. В некоторых вариантах осуществления заболевания, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат приготавливают для доставки в стекловидное тело глаза субъекта (например, для инъекции в стекловидное тело).

В настоящем документе также предлагается композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для использования при лечении заболевания, ассоциированного с IL-6. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой глазное заболевание, например глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6 в стекловидном теле. В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для использования при лечении диабетического макулярного отека (DME), диабетической ретинопатии, увеита, сухого глаза (например, болезни сухого глаза или синдрома сухого глаза), возрастной макулярной дистрофии (AMD), пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), регматогенной отслойки сетчатки (RRD), окклюзии вены сетчатки (RVO), нейромиелита зрительного нерва (NMO), трансплантата роговицы, эрозии роговицы или механической травмы глаза.

В настоящем документе предлагается также способ лечения заболевания, ассоциированного с IL-6, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против IL-6 или фрагмента, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой глазное заболевание, например глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6 в стекловидном теле. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек (DME), диабетическую ретинопатию, увеит, сухой глаз (например, болезнь сухого глаза или синдром сухого глаза), возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), регматогенную отслойку сетчатки (RRD), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелит зрительного нерва (NMO), трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза. В некоторых вариан-

тах осуществления заболевания, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент или композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, доставляется в стекловидное тело глаза субъекта (например, посредством инъекции в стекловидное тело). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент или композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предназначается для инъекции в стекловидное тело.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек, и антитело или фрагмент или композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, доставляется в стекловидное тело глаза субъекта.

В настоящем документе также предлагается антитело или его фрагмент (например, антигенсвязывающий фрагмент) (например, антитело против IL-6 или его фрагмент, как описано в настоящем документе) или композиция, содержащая такое антитело или его фрагмент, для использования при лечении заболевания, ассоциированное с IL-6 (например, для использования при лечении субъекта, например субъекта человека, имеющего заболевание, ассоциированное с IL-6).

В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6, например, в стекловидном теле. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек (DME), диабетическую ретинопатию, увеит, сухой глаз (например, расстройство сухого глаза или болезнь сухого глаза), аллергический конъюнктивит, возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), регматогенную отслойку сетчатки (RRD), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелит зрительного нерва (NMO), трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой DME. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой болезнь сухого глаза. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой синдром сухого глаза. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой увеит. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой AMD. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой PDR. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент (например, антигенсвязывающий фрагмент) является пригодным для доставки в стекловидное тело глаза. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент (например, антигенсвязывающий фрагмент) доставляется в стекловидное тело глаза.

В настоящем документе предлагается также способ лечения заболевания, ассоциированного с IL-6, способ включает введение субъекту антитела против IL-6 или его фрагмента (например, его антигенсвязывающего фрагмента), например антитела против IL-6 или его фрагмента, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело против IL-6 или его фрагмент (например, его антигенсвязывающий фрагмент) вводится в терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой глазное заболевание, характеризуемое повышенным уровнем IL-6 в стекловидном теле. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек (DME), диабетическую ретинопатию, увеит, синдром сухого глаза, болезнь сухого глаза, возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелит зрительного нерва (NMO), трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент (например, его антигенсвязывающий фрагмент) является пригодным для доставки в стекловидное тело глаза. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент (например, его антигенсвязывающий фрагмент) доставляется в стекловидное тело глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек, и антитело или его фрагмент доставляется в стекловидное тело глаза субъекта.

В настоящем документе также предлагается набор, содержащий антитело против IL-6 или композицию, описанную в настоящем документе, и, необязательно, инструкции для применения.

В настоящем документе также предлагается контейнер или устройство, например устройство для доставки лекарственного средства, содержащее антитело против IL-6 или композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления указанное устройство конфигурируется для доставки антитела или композиции в глаз, например в стекловидное тело. В настоящем документе также предлагается набор, содержащий указанный контейнер или устройство.

Как используется в настоящем документе, термин "антитело" является синонимом иммуноглобулина и должен пониматься как повсеместно известный в данной области. Термин "антитело" не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, термин "антитело" включает, среди прочего, рекомбинантные антитела, моноклональные антитела и поликлональные антитела. Как

используется в настоящем документе, антитело представляет собой тетрамер, и если не описано иного, каждое из них состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Аминоокончания каждой цепи содержат вариабельную область примерно из 100-120 или более аминокислот, которые играют главную роль при распознавании антигена. Часть с карбоксиокончанием каждой цепи содержит константную область с главной ролью для эффекторной функции антитела. Классы легких цепей человека определяют, как  $\kappa$  и  $\lambda$  легкие цепи. Классы тяжелых цепей представляют собой  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  или  $\epsilon$ , и они определяют изотип антитела. Изотипы антитела представляют собой IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединяются с областью "J" примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь содержит также область "D" примерно из трех или более аминокислот.

Вариабельные области каждой пары тяжелая/легкая цепь (VH и VL), соответственно, образуют сайт связывания антигена. Соответственно, интактное антитело IgG содержит, например, два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифичных антител эти два сайта связывания являются одинаковыми.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, определяемыми также как области, определяющие комплементарность, или CDR. Термин "вариабельный" относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов различаются в широких пределах по последовательности среди антител и вовлечены в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. Вариабельность заключается, прежде всего, в CDR, которые разделяются более консервативными каркасными областями (FR). Приписывание аминокислот к каждому домену осуществляется в соответствии с определениями Rabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) или Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989), которые описывают способы, известные в данной области.

"Дикий тип" может относиться к наиболее преобладающему аллелю или к видам, обнаруживаемым в популяции, или к антителу, полученному от животного, не подвергнутого никакому воздействию, по сравнению с аллелем или полиморфизмом или вариантом или производным, получаемым с помощью некоторой формы воздействия, такого как мутагенез, использование рекомбинантных методов и т.п., для замены аминокислоты молекулы, связывающей антиген.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактной цепи или цепи полной длины или к антителу, как правило, к целевой области связывания или вариабельной области. Примеры фрагментов антитела включают, но не ограничиваясь этим, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и фрагменты Fv. "Функциональный фрагмент" или "аналог сайта II антитела анти-IL-6" представляет собой фрагмент, который может предотвращать или существенно уменьшать способность IL-6 к связыванию рецептора, уменьшать способность комплекса IL-6/IL-6R к связыванию с gp130 или уменьшать способность лиганда к связыванию с gp130 или к иницированию передачи сигналов. Как используется в настоящем документе, "антигенсвязывающий фрагмент" или "функциональный фрагмент", как правило, является синонимом "фрагмента антитела" и может относиться к таким фрагментам, как Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и т.д., которые могут предотвращать или существенно уменьшать способность IL-6 к связыванию рецептора, уменьшать способность комплекса IL-6/IL-6R к связыванию с gp130 или к иницированию передачи сигналов.

"Производное" антитела представляет собой полипептид, который содержит по меньшей мере одну CDR антитела, описанного в настоящем документе. Как правило, производное может связываться с сайтом II IL-6.

"Конкурировать" означает, что первое антитело или его фрагмент может конкурировать за связывание со вторым антителом или его фрагментом таким образом, что связывание первого антитела с его эпитопом детектируемо уменьшается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. В некоторых случаях термин может также относиться к связыванию второго антитела с его эпитопом, которое детектируемо уменьшается в присутствии первого антитела. Механизм такой конкуренции может осуществляться посредством, в неограничивающих примерах, стерического затруднения, конформационных изменений, связывания с общим эпитопом.

Термин "процент идентичности последовательностей" в контексте последовательностей нуклеиновых кислот означает остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми, при выравнивании для максимального соответствия. Длина сравнения идентичности последовательности может составлять по меньшей мере примерно девять нуклеотидов, например по меньшей мере примерно 18 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 24 нуклеотида, по меньшей мере примерно 28 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 32 нуклеотида, по меньшей мере примерно 36 нуклеотидов или по меньшей мере примерно 48 или более нуклеотидов. Алгоритмы, известные в данной области, могут использоваться для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей. Например, последовательности полинуклеотидов могут сравниваться с использованием FASTA, Gap или Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). FASTA включает, например, программы FASTA2 и

FASTA3, обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson, *Methods Enzymol* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); включается в настоящий документ в качестве ссылки). Как правило, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновых кислот может определяться с использованием FASTA с ее параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы оценок) или с использованием Gap с ее параметрами по умолчанию, как предусмотрено в GCG Version 6.1, они включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

Термин "процент идентичности последовательностей" в контексте последовательностей аминокислот означает остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми, когда они выравниваются при максимальном соответствии. Длина сравнения идентичности последовательностей может превышать по меньшей мере примерно пять остатков аминокислот, например составлять по меньшей мере примерно 20 остатков аминокислот, по меньшей мере примерно 30 остатков аминокислот, по меньшей мере примерно 50 остатков аминокислот, по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот, по меньшей мере примерно 150 остатков аминокислот или по меньшей мере примерно 200 или более остатков аминокислот. Идентичность последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Алгоритмы для определения процента идентичности последовательностей известны в данной области. Например, последовательности аминокислот могут сравниваться с использованием FASTA, Gap или Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). Программное обеспечение для анализа белков согласует последовательности с использованием мер подобия, приписываемых различным замещениям, делециям и другим модификациям, включая консервативные замещения аминокислот. Например, GCG содержит программы, такие как "Gap" и "Bestfit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию, как указано в программах, для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его аналогом. См., например, GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, Madison, WI). Последовательности полипептидов также можно сравнивать с использованием FASTA, используя параметры по умолчанию или рекомендованные параметры, см. GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей для областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson, *Methods Enzymol* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Другой алгоритм, который можно использовать при сравнении последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, например blastp или tblastn, с использованием параметров по умолчанию, как поставляется вместе с программами. См., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res* 25:3389-402 (1997).

Белок или полипептид является "по существу, чистым", "по существу, гомогенным" или "по существу, очищенным", когда по меньшей мере примерно 60-75% образца демонстрируют одинаковые виды полипептида. Полипептид или белок может быть мономерным или мультимерным. По существу, чистый полипептид или белок может содержать примерно 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 99% чистого полипептида; например, по существу, чистый полипептид или белок является чистым на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 99%. Чистота или гомогенность белка может оцениваться с помощью любых соответствующих средств, таких как электрофорез на полиакриламидном геле образца белка с последующей визуализацией одной или нескольких полос, ассоциированное с белком или полипептидом (например, при окрашивании геля), эксклюзионной ВЭЖХ, катионообменной ВЭЖХ, восстановительного капиллярного электрофореза в SDS, пептидного картирования или гликанового картирования. Более высокое разрешение может быть достигнуто с использованием, например, способов, известных в данной области, или других средств очистки.

Термин "по существу подобие", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными инсерциями или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или с ее комплементарной нитью) имеется идентичность последовательности нуклеотидов по меньшей мере примерно у 85%, по меньшей мере примерно у 90% и по меньшей мере примерно у 95, 96, 97, 98 или у 99% нуклеотидных оснований, например идентичность последовательностей 85, 90, 95, 96, 98 или 99%, как измерено с помощью любого известного алгоритма для идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap.

В применении к полипептидам термин "по существу идентичность" или "по существу подобие" означает, что две последовательности аминокислот при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GPE или BESTFIT с использованием весов разрезов по умолчанию, как поставляется вместе с программами, разделяют между собой идентичность последовательностей по меньшей мере примерно на 70, 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%; например идентичность последовательностей 70, 75, 80, 90, 95, 96,

97, 98 или 99%. В определенных вариантах осуществления положения остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными замещениями аминокислот.

"Терапевтически эффективное количество" относится к тому количеству терапевтического агента, который при введении будет облегчать по меньшей мере один признак или симптом заболевания, которое лечится, или усиливать или улучшать профилактическое или терапевтическое воздействие (воздействия) другой терапии (например, другого терапевтического агента), полезного для лечения заболевания, ассоциированного с IL-6.

Понятно, что терапевтически эффективное количество может вводиться во множестве доз в течение ограниченного периода времени или в виде хронического лечения.

"Лечить", "леченный" и "лечение" относятся к способу облегчения одного или нескольких признаков или симптомов заболевания.

Как используется в настоящем документе, термин "заболевание" включает заболевания и расстройства.

Полное описание каждого патентного документа и научной статьи, упоминаемой в настоящем документе, и патентные документы и научные статьи, цитируемые при этом, включаются в настоящий документ в явном виде в качестве ссылок для всех целей.

Дополнительные особенности и преимущества настоящего изобретения описываются более конкретно ниже.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, иллюстрирующий результаты эксперимента, при котором антитело анти-IL-6 вводится IVT (в стекловидное тело) модели крыс CNV. Антитело анти-VEGF вводится в качестве положительного контроля, и отрицательный контроль представляет собой несущую среду саму по себе;  $p=0,0054$  в день 15 и  $p=0,0005$  в день 22 для антитела анти-IL-6 по сравнению с контролем с несущей средой.

Фиг. 2 представляет собой график, иллюстрирующий результаты исследования с помощью эксперимента по связыванию относительно способности антитела 64 мышинных к ингибированию связывания IL-6/IL-6R с gp130.

Фиг. 3A представляет собой график, иллюстрирующий эксперимент, в котором 020 исследуют на способность к блокированию передачи сигналов IL-6 в отсутствие избытка растворимого IL-6R $\alpha$ . Эксперименты осуществляют в клетках HEK-Blue-IL-6 с 0,2 нг/мл IL-6 и 2 мкг/мл IL-6R $\alpha$ .

Фиг. 3B представляет собой график, иллюстрирующий эксперимент, в котором 020 исследуют на способность к блокированию передачи сигналов IL-6 в присутствии избытка растворимого IL-6R $\alpha$ . Эксперименты осуществляют в клетках HEK-Blue-IL-6 с 0,2 нг/мл IL-6 и 2 мкг/мл IL-6R $\alpha$ .

Фиг. 4 представляет собой график, иллюстрирующий результаты эксперимента, при котором моноклональное антитело анти-IL-6 ("блокада IL-6") вводят IVT в модели мышей с CNV. Контроли представляют собой отсутствие лечения (противоположный глаз), инъекцию в стекловидное тело антитела анти-VEGF ("блокада VEGF") или инъекцию в стекловидное тело контроля, изотипа антитела анти-HRP ("контрольное антитело").

Фиг. 5 показывает связывание с IL-6 по сравнению с антителом дикого типа (EBI-029) для антител, имеющих следующие мутации: (1) I51T/S55G, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G и (4) A28V/S30P/I51T/S55G (упоминается также как EBI-030).

Фиг. 6 показывает относительную величину передачи сигналов в репортерных клетках HEK-Blue™ IL6, обработанных IL-6 и одним из следующих Fab: (1) (EBI-029) WT, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

Фиг. 7 показывает люминесценцию (меру пролиферации, индуцируемой IL-6) в клетках T1165.85.2.1, обработанных IL-6 и одним из следующих Fab при показанной концентрации: (1) (EBI-029) WT, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

Фиг. 8 показывает относительную величину передачи сигналов в репортерных клетках HEK-Blue™ IL6, обработанных 20 пМ IL-6 и различными концентрациями (1) EBI-029 IgG2 (EBI029), продуцируемых в клетках HEK-6E; (2) EBI-030 IgG2 (EBI030), продуцируемых в клетках HEK-6E; (3) EBI-030 IgG2-H311A (EBI030 H311A), продуцируемых в клетках HEK-6E; (4) тоцилизумабом (TOCI) и (5) EBI-030 IgG2, продуцируемым в стабильном пуле CHO (EBI-030 CHO).

Фиг. 9 демонстрирует фармакокинетическую модель, описанную в примере 20.

Фиг. 10 демонстрирует влияние улучшения эффективности антитела на продолжительность ингибирования IL-6 в глазу, как смоделировано с использованием фармакокинетической модели, описанной в примере 20.

Фиг. 11 показывает концентрацию лекарственного средства в стекловидном теле для EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eulea® и тоцилизумаба (TCZ) как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 12 показывает концентрацию лекарственного средства в сетчатке для EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eulea® и тоцилизумаба (TCZ) как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 13 показывает концентрацию лекарственного средства во внутриглазной жидкости для EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea® и тоцилизумаба (TCZ) как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 14 показывает концентрацию лекарственного средства в сосудистой оболочке глаза для EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea® и тоцилизумаба (TCZ) как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 15А демонстрирует положения FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, шарнира, CH2 и CH3 в последовательностях тяжелой цепи EBI-029 (SEQ ID NO: 11), EBI-030 (SEQ ID NO: 41) и EBI-031 (EBI-031 также упоминается в настоящем документе как EBI-030-H311A) (SEQ ID NO: 47).

Фиг. 15В демонстрирует положения FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 и СК в последовательности легкой цепи (EBI-029, EBI-030 и EBI-031 имеют одинаковую последовательность легкой цепи) (SEQ ID NO: 12).

Фиг. 16А показывает относительную величину передачи сигналов в репортерных клетках HEK-Blue™ IL-6, обработанных 20 пМ IL-6 и различными концентрациями EBI-031 или тоцилизумаба.

Фиг. 16В показывает относительную величину передачи сигналов в репортерных клетках HEK-Blue™ IL-6, обработанных 200 пМ гипер IL-6 и различными концентрациями EBI-031 или тоцилизумаба.

Фиг. 17 показывает результаты компьютерного моделирования, описанного в примере 24.

Фиг. 18 показывает схематическую диаграмму трех различных структурных изоформ антител IgG2, вызванных дисульфидным шафлингом.

Фиг. 19 показывает хроматограммы ВЭЖХ с обращенной фазой образцов EBI-031: необработанные (верхняя панель), 5 мМ DTT (средняя панель), 10 мМ цистеина (нижняя панель).

Фиг. 20 показывает хроматограммы ВЭЖХ с обращенной фазой образцов EBI-031, собранных из различных линий клеток EBI-031: культура в масштабе 200 л клональной линии клеток (верхняя панель), культура в масштабе 10 л линии родительских клеток (средняя панель) и пул стабильно трансфицированных клеток (нижняя панель).

Фиг. 21 показывает хроматограмму ВЭЖХ с обращенной фазой EBI-031, собранных из культуры в масштабе 200 л клональной линии клеток, и обозначает и количественно определяет, какие именно изоформы представлены каждым пиком на хроматограмме.

Фиг. 22А представляет собой график, показывающий фармакокинетические данные от африканской зеленой мартышки (K797), как описано в примере 26.

Фиг. 22В представляет собой график, показывающий фармакокинетические данные от африканской зеленой мартышки (K679), как описано в примере 26.

Фиг. 23 представляет собой график, показывающий как фармакокинетические данные от африканских зеленых мартышек (K797 или K679), так и подгоночные кривые.

Фиг. 24А показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в жидкой части стекловидного тела как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24В показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 во внутриглазной жидкости как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24С показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в сосудистой оболочке глаза как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24D показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в конъюнктиве как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24Е показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в роговице как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24F показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в цилиарном теле радужной оболочки как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24G показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в хрусталике как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24H показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в сетчатке как функцию времени после введения в стекловидное тело.

Фиг. 24I показывает концентрацию лекарственного средства EBI-031 в склере как функцию времени после введения в стекловидное тело.

#### Подробное описание

IL-6 описывается в качестве агента, играющего роль в ряде заболеваний, таких как ревматоидный артрит, и как сообщается, является значительно апрегулируемым при ряде заболеваний, включая глазные заболевания. IL-6 может действовать как по цис-, так и по транс-механизмам. При цис-механизме считается, что свободный IL-6 связывается со связанным с мембраной рецептором IL-6 (IL-6R упоминается также как IL-6R $\alpha$  и CD126), а затем комплекс IL-6/IL-6R взаимодействует с gp130 (упоминается также как CD130, рецептор онкостатина М, IL-6R $\beta$  и переносчик сигналов IL-6) для активации передачи сигналов в клетке, содержащей комплекс. При транс-механизме свободный IL-6 связывается с растворимым рецептором IL-6 (sIL-6R). Затем комплекс IL-6/sIL-6R может связываться с gp130, присутствующими в

мембране клетки. Ключевое различие между этими механизмами заключается в том, что gp130 экспрессирует большее количество типов клеток, чем экспрессирует IL-6R, экспрессирование которого является более ограниченным. По этой причине при заболеваниях, при которых является желательным ингибирование передачи сигналов IL-6, например, при которых желательно в широком смысле ингибировать передачу сигналов IL-6, полезно ингибировать передачу сигналов как цис-, так и транс-IL-6. Авторы настоящей заявки получили с помощью генной инженерии антагонисты IL-6, например антитела анти-IL-6, фрагменты и производные, которые могут ингибировать передачу сигналов как цис-, так и транс-IL-6. В дополнение к этому авторы настоящей заявки получили с помощью генной инженерии такие антагонисты IL-6 для достижения более быстрого системного выведения. Антагонисты IL-6, например антитела против IL-6 и их фрагменты или производные, описываются в WO 2014/074905, полное содержание которой тем самым включаются в настоящий документ в качестве ссылки. Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам против IL-6 и к их применениям.

Как используется в настоящем документе, термины в единственном числе включают и множественное число, если контекст четко не указывает иного.

#### **Особенности антагонистов IL-6 (IL-6a)**

Как правило, антагонист IL-6 (IL-6a), описанный в настоящем документе, специфично связывается с сайтом II (сайтом 2) IL-6 и является полезным при лечении глазного заболевания, связанного с IL-6, и определенных других заболеваний. Глазное заболевание, связанное с IL-6, представляет собой заболевание, при котором нежелательный симптом или биологическая активность заболевания ассоциируется с экспрессированием или присутствием IL-6. В некоторых вариантах осуществления IL-6a имеет высокое сродство как к свободному, так и к связанному IL-6, и является относительно стабильным в организме, может ингибировать связывание с gp130 IL-6 связанного с IL-6R (в настоящем документе определяется как комплекс IL-6/IL-6R или IL-6/IL-6R), и может оказывать терапевтическое воздействие. Как правило, IL-6a представляет собой антитело или получается из антитела. Например, IL-6a представляет собой имеющий высокое сродство гуманизированный Fab, который может специфично связываться с сайтом II IL-6 и мощно блокирует передачу сигналов как цис-, так и транс-IL-6. В другом примере IL-6a представляет собой антитело полной длины, например антитело IgG1 или IgG2.

В некоторых вариантах осуществления Fab также конфигурируется как последовательность Fc, полученная с помощью генной инженерии, или находится в антителе полной длины. В некоторых вариантах осуществления IL-6a с Fc, полученным с помощью генной инженерии (например, Fab с Fc, полученным с помощью генной инженерии), имеет более быстрое системное выведение по сравнению с соответствующим контролем, например по сравнению с соответствующим антителом, его фрагментом или производным, которое не имеет Fc, полученного с помощью генной инженерии. Эти и другие особенности IL-6a описываются далее в настоящем документе.

Авторы настоящей заявки разработали антагонисты IL-6, которые селективно связываются с сайтом II IL-6, для обеспечения в широком смысле ингибирования передачи сигналов IL-6, поскольку такие молекулы могут ингибировать связывание gp130 с IL-6, независимо от того, является ли IL-6 свободным или связанным с мембраной IL-6R или SIL-6R. Кроме того, нацеливание лиганда (IL-6), в противоположность рецептору IL-6, может устранить медируемое рецептором выведение и токсичность, вызываемую ADCC (антителозависимую клеточно-медируемую цитотоксичность).

Поскольку IL-6 играет как патологическую, так и защитную роль при заболевании, использование антагониста IL-6 (IL-6a) для лечения заболевания, ассоциированного с повышенным уровнем IL-6, может улучшить определенные аспекты состояния, но может также вызывать значительные отрицательные воздействия, например системные воздействия. Эта двойственность путей IL-6 (т.е. способность оказывать желательные и/или нежелательные воздействия) может сделать нежелательным лечение расстройства, ассоциированного с IL-6, с помощью системного ингибитора. Соответственно, композиции и способы, предлагаемые в настоящем документе, могут быть полезными при лечении, которое ингибирует по меньшей мере одну активность IL-6, но не оказывает ненужного воздействия на положительные активности IL-6, в частности, поскольку композиции могут приготавливаться для локальной доставки, например для локальной доставки в глаз. Например, в определенных аспектах IL-6a разрабатывается таким образом, чтобы он имел размер, пригодный для доставки в конкретное место. В некоторых вариантах осуществления IL-6a представляет собой антитело полной длины. В некоторых вариантах осуществления IL-6a получается из антитела, и оно имеет формат, который может иметь более продолжительное удерживание в стекловидном теле глаза и ограниченную системную утечку. В некоторых вариантах осуществления IL-6a представляет собой модифицированное антитело (например, антитело с модифицированным доменом Fc), которое имеет более продолжительное удерживание в стекловидном теле глаза и/или более ограниченную системную утечку по сравнению с соответствующим немодифицированным антителом. В некоторых вариантах осуществления IL-6a представляет собой антитело IgG2.

В некоторых аспектах IL-6a представляет собой относительно малый IL-6a, такой как фрагмент антитела или другое производное антитела, которое меньше чем антитело полной длины, например Fab, который получают из антитела против IL-6. В некоторых случаях IL-6a представляет собой формат, который может проходить из одной части ткани в другую с улучшенной кинетикой по сравнению с соот-

ветствующим антителом против IL-6 полной длины. В некоторых вариантах осуществления IL-6а представляет собой Fab, который получают с помощью генной инженерии таким образом, чтобы он представлял собой молекулу больших размеров, которая с большей вероятностью имеет повышенное удержание в том положении, в которое она доставляется, по сравнению с Fab самим по себе, например, IL-6а димеризуется с помощью домена Fc. В определенных вариантах осуществления домены Fc получают с помощью генной инженерии таким образом, что остаток Fc имеет уменьшенную массу или уменьшенное связывание с FcRn, что может уменьшить системную аккумуляцию по сравнению с таким же объектом связывания IL-6, который содержит Fc дикого типа. Домен Fc, полученный с помощью генной инженерии, может представлять собой, например, домен IgG1 или домен IgG2.

Как правило, антагонисты IL-6, описанные в настоящем документе, имеют достаточно высокое сродство к их мишени IL-6, чтобы они были эффективными при ослаблении, по меньшей мере, одного нежелательного воздействия IL-6 и были достаточно стабильными для того, чтобы они были пригодными для использования в качестве терапевтических средств.

Как правило, РК IL-6а, например IL-6а, пригодного для использования в глазу, имеет достаточно длительное время полужизни в месте доставки, например стекловидном теле, для оказания терапевтического воздействия. В неограничивающих примерах РК может соответствовать времени полужизни по меньшей мере 8 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней или 30 дней.

### **Идентификация связывания антагонистов IL-6 с сайтом II**

Как правило, любой способ, известный в данной области, может использоваться для генерирования молекулы, которая может связываться с IL-6, например, библиотеки полипептидов или молекулярные библиотеки могут просматриваться относительно соединений кандидатов при анализе способности полипептида или соединения к связыванию с IL-6. После определения такого соединения кандидата сайт связывания соединения может определяться с использованием способов, известных в данной области. Например, молекула может исследоваться относительно способности связываться с IL-6 дикого типа, и это связывание сравнивается со способностью соединения к связыванию с IL-6, мутировавшим на сайте I, сайте II или сайте III. В некоторых вариантах осуществления IL-6а, как описано в настоящем документе, сохраняет способность к связыванию с комплексом IL-6/IL-6R $\alpha$  и с IL-6 и предотвращает связывание IL-6/IL-6R $\alpha$  с gp130. В некоторых вариантах осуществления IL-6а, как описано в настоящем документе, может конкурировать с gp130 за связывание с комплексом IL-6/IL-6R $\alpha$ , например, посредством связывания с сайтом II IL-6. Такие активности связывания могут анализироваться с использованием способов, известных в данной области.

Кандидаты в IL-6а могут исследоваться, например, с помощью системы анализов с использованием НЕК-Blue™ IL-6 (InvivoGen, San Diego). Клетки НЕК-Blue™ IL-6 представляют собой клетки НЕК293, которые стабильно трансфицированы IL-6R человека и STAT3-индуцируемым репортерным геном SEAP. В присутствии IL-6 STAT3 активируется, и секретируется SEAP. SEAP оценивается с использованием, например, QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego). Добавление антагониста IL-6 к клеткам предотвращает секрецию SEAP или уменьшает его уровень в результате ингибирования как свободного, так и связанного с растворимыми рецепторами IL-6.

$K_D$  относится к константе равновесия сродства связывания конкретного взаимодействия антитело-антиген или взаимодействия фрагмент антитела-антиген. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, связывается с антигеном (например, IL-6) с  $K_D$ , которая равна или меньше чем 250 пМ, например равна или меньше чем 225, 220, 210, 205, 150, 100, 50, 20, 10 или 1 пМ.  $K_D$  может определяться с использованием способов, известных в данной области, например с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы ViaCore™.

$K_{off}$  относится к постоянной скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или комплекса фрагмент антитела-антиген. Постоянная скорости диссоциации может определяться с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием системы ViaCore™. Относительно малая  $K_{off}$  может вносить вклад в желательные особенности терапевтического средства, например, делая возможным менее частое введение ингибитора субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

### **Специфичность**

В некоторых вариантах осуществления IL-6а, описанный в настоящем документе, специфично связывается с мишенью, например с IL-6. Как правило, "специфичное связывание", как используется в настоящем документе, указывает, что молекула преимущественно связывается с выбранной молекулой и демонстрирует гораздо более низкое сродство связывания с одной или несколькими другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления сродство связывания с другой молекулой на 1, 2, 3 или больше порядков величины ниже, чем сродство связывания с мишенью.

Как обсуждается выше, IL-6 может присутствовать как свободный IL-6, так и IL-6, связанный с растворимым IL-6R $\alpha$ . Авторы настоящей заявки определили сайт II IL-6 в качестве оптимальной мишени для антагониста IL-6 по сравнению с ингибитором, который связывается с сайтом I IL-6. Ингибитор сай-

та I может ингибировать связывание свободного IL-6 с IL-6R $\alpha$ . Однако такой ингибитор не может предотвращать активность, инициируемую посредством ранее существующих комплексов IL-6/IL-6R, за исключением замещения, ограничиваемого  $K_{off}$  комплекса. Другая альтернатива, ингибитор, который связывается с IL-6R $\alpha$ , является менее пригодным для использования, поскольку он может обладать ограниченной способностью к предотвращению активности IL-6, если только он не присутствует в насыщающих концентрациях. Поскольку количество рецептора IL-6, как правило, является исключительно высоким по сравнению с количеством IL-6, этот подход может потребовать введения нежелательно большого количества композиции, которая ингибирует активность IL-6 посредством связывания с рецептором. В некоторых вариантах осуществления антагонисты IL-6, описанные в настоящем документе (например, антитела и их фрагменты, и производные, описанные в настоящем документе), могут блокировать активность IL-6, даже когда IL-6 связан с IL-6R. Соответственно, преимущество IL-6а, как описано в настоящем документе, заключается в том, что может потребоваться относительно меньшее количество композиции для введения с целью достижения терапевтического воздействия по сравнению с ингибитором, нацеленным на рецептор IL-6. Антитела антирецептор, как сообщается, могут быстро выводиться посредством выведения, медируемого рецептором, значительно ограничивая их РК, при этом требуются более высокие дозы, более частое дозирование или как то, так и другое. В дополнение к этому антитела как антирецептор, так и анти-сайт I IL-6 доставляют ту проблему, что они значительно увеличивают концентрацию IL-6 в тканях посредством разрушения нормального медируемого рецепторами пути выведения лиганда, тем самым экспонируя субъекта для потенциально нежелательных уровней IL-6 в тканях. Кроме того, использование ингибитора, нацеленного на IL-6R $\alpha$ , может сделать необходимым присутствие ингибитора как вблизи сайта, на котором предполагается ингибирование, так и на сайте, для которого это является нежелательным, например, как системное лечение. Использование IL-6а, который связывает сайт II, сайт, с которым связывается gp130, делает возможным ингибирование с помощью свободного IL-6, а также IL-6, который связан с IL-6R, но еще и не активирует путь IL-6 посредством gp130. Соответственно, без желания ограничиваться теорией, антагонисты IL-6, описанные в настоящем документе, разрабатываются для связывания обеих форм IL-6 (растворимого и связанного с рецептором), конкретно, антагонисты IL-6 связываются с сайтом II IL-6, который доступен в обеих формах. Композиции, содержащие IL-6а, как описано в настоящем документе, могут ингибировать передачу сигналов как цис-, так и транс-IL-6.

В некоторых случаях соединения и способы, предлагаемые в настоящем документе, разрабатываются для обеспечения эффективной блокады IL-6, достаточной для лечения по меньшей мере одного признака или симптома расстройства, ассоциированного с IL-6, например для ингибирования ангиогенеза и/или воспаления.

Соединения, описанные в настоящем документе, являются пригодными для использования при лечении глазных заболеваний, характеризуемых нежелательно высоким уровнем IL-6, например, в стекловидном теле (см. Yuuki et al., *J. Diabetes Compl.* 15:257 (2001); Funatsu et al., *Ophthalmology* 110: 1690, (2003); Oh et al., *Curr Eye Res* 35:1116 (2010); Noma et al., *Eye* 22:42 (2008); Kawashima et al., *Jpn. J. Ophthalmol* 51:100 (2007); Kauffman et al., *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 35:900 (1994); Miao et al., *Molec. Vis.* 18:574(2012)).

Как правило, IL-6а, как описано в настоящем документе, представляет собой сильнодействующий антагонист передачи сигналов IL-6. В некоторых вариантах осуществления IL-6а, описанный в настоящем документе, имеет высокое сродство к IL-6, например  $IC_{50}$ , равное или меньше чем 100 пМ при анализе с использованием НЕК-Blue IL-6 с 10 пМ IL-6. Высокое сродство IL-6а можно определить на основе  $K_D$  IL-6а, например значения  $K_D$ , равного или меньшего чем 1 нМ, равного или меньшего чем 500 пМ, равного или меньшего чем 400 пМ, равного или меньшего чем 300 пМ, равного или меньшего чем 240 пМ или равного или меньшего чем 200 пМ.

Для продуцирования биологического IL-6а (например, белка или полипептида, такого как антитело, его фрагмент или производное), который является пригодным для использования при лечении расстройства, ассоциированного с увеличением экспрессирования или активности IL-6, как правило, желательно, чтобы биологический IL-6а имел высокую продуктивность. Например, пригодная для использования продуктивность равна или больше чем 1 г/л (например, равна или больше чем 2 г/л, равна или больше чем 5 г/л или равна или больше чем 10 г/л).

Для эффективного введения антагониста IL-6 необходимо, чтобы ингибитор имел растворимость, совместимую с концентрацией, при которой он будет вводиться. Например, в случае антитела IL-6а полной длины растворимость равна или больше чем 20 мг/мл, равна или больше чем 10 мг/мл, равна или больше чем 5 мг/мл или равна или больше чем 1 мг/мл.

Кроме того, для осуществления жизнеспособного лечения ингибитор должен иметь высокую стабильность при температуре тела для мест доставки и активности, а также стабильность при хранении. В некоторых вариантах осуществления ингибитор имеет  $T_m$ , равную или большую чем 60°C (например, равную или большую чем 60°C, равную или большую чем 62,5°C, равную или большую чем 65°C, равную или большую чем 70°C, равную или большую чем 73°C или равную или большую чем 75°C). В не-

которых вариантах осуществления ингибитор имеет  $T_{\text{onset}}$  равную или большую чем  $45^{\circ}\text{C}$ , например равную или большую чем  $50^{\circ}\text{C}$ , равную или большую чем  $51^{\circ}\text{C}$ , равную или большую чем  $55^{\circ}\text{C}$  или равную или большую чем  $60^{\circ}\text{C}$ . Способы определения  $T_m$  и  $T_{\text{onset}}$  могут определяться с использованием способов, известных в данной области.

Антагонисты, имеющие желаемые особенности, могут выбираться из соответствующих типов молекул, известных в данной области, например из антител, включая фрагменты и производные антитела, нацеленного на сайт II IL-6, которое, как правило, удерживает или сохраняет существенные особенности исходного антитела против IL-6 (например, желаемые свойства связывания). Такие антагонисты включают фрагменты  $F_{\text{ab}}$ , фрагменты scFvs,  $F_{\text{ab}}$ , полученные с помощью генной инженерии таким образом, чтобы они содержали остаток  $F_c$ , и антитела полной длины, полученные с помощью генной инженерии таким образом, чтобы они имели каркас, отличный от исходного антитела, нацеленного на сайт II IL-6.

В некоторых аспектах IL-6а, описанный в настоящем документе, содержит сайт связывания антигена антитела человека, который может конкурировать или перекрестно конкурировать с антителом или его фрагментом, который может связываться с сайтом II IL-6. Например, антитело или его фрагмент может состоять из домена VH и домена VL, описанных в настоящем документе, и домены VH и VL содержат набор CDR антитела, связывающего сайт II IL-6, описанный в настоящем документе.

Любой пригодный для использования способ можно использовать для определения домена и/или эпитопа, связанного с помощью IL-6а, например, посредством мутации различных сайтов на IL-6. Это те сайты, мутации которых либо предотвращают или уменьшают связывание IL-6а и лиганда IL-6, либо непосредственно вовлечены в связывание с IL-6а, либо опосредованно влияют на сайт связывания, например, посредством влияния на конформацию IL-6. Другие способы можно использовать для определения аминокислот, связанных с помощью IL-6а. Например, можно использовать сканирование с пептидным связыванием, такое как иммуноанализ со связанными ферментами на основе PEPSCAN (ELISA). При сканировании с пептидным связыванием этого типа, короткие перекрывающиеся пептиды, полученные из антигена, систематически просматриваются относительно связывания с элементом связывания.

Пептиды могут быть ковалентно связаны на поверхности подложки с формированием пептидной матрицы. Пептиды могут находиться в линейной или ограниченной конформации. Ограниченная конформация может быть получена с использованием пептидов, имеющих конечный цистеиновый (цис) остаток на каждом конце пептидной последовательности. Цис-остатки могут ковалентно связываться непосредственно или опосредованно с поверхностью подложки таким образом, что пептид поддерживается в петлевой конформации. Соответственно, пептид, используемый в этом способе, может иметь цис-остаток, добавленный на каждом конце последовательности пептидов, соответствующей фрагменту антигена. Могут также использоваться пептиды с двойной петлей, в которых цис-остаток дополнительно располагается в середине последовательности пептидов или вблизи нее. Цис-остатки могут ковалентно связываться непосредственно или опосредованно с поверхностью подложки таким образом, что пептиды формируют двойную петлевую конформацию, с одной петлей по каждую сторону от центрального цис-остатка. Пептиды могут генерироваться синтетически, и, следовательно, цис-остатки могут быть получены с помощью генной инженерии в желаемых положениях, несмотря на то, что они не встречаются в природе в последовательности сайта II IL-6. Необязательно как линейные, так и ограниченные пептиды могут просматриваться в анализе с пептидным связыванием. Сканирование с пептидным связыванием может включать идентификацию (например, с использованием ELISA) набора пептидов, с которым связывается элемент связывания, где пептиды имеют последовательности аминокислот, соответствующие фрагментам IL-6а (например, пептиды, которые содержат примерно 5, 10 или 15 смежных остатков IL-6а), и выравнивание пептидов для определения области узнавания остатков, связанных с элементом связывания, где область узнавания содержит остатки общие для перекрывающихся пептидов. Альтернативно или в дополнение к этому, способ сканирования с пептидным связыванием можно использовать для идентификации пептидов, с которыми IL-6а связывается при наименьшем выбранном отношении сигнал:шум.

Другие способы, известные в данной области, можно использовать для определения остатков, связанных посредством антитела, и/или для подтверждения результатов сканирования с пептидным связыванием, включая, например, сайт-направленный мутагенез (например, как описано в настоящем документе), водородно-дейтериевый обмен, масс-спектрометрию, ЯМР и рентгеновскую кристаллографию.

Как правило, IL-6а, пригодный для использования, как описано в настоящем документе, представляет собой молекулу антитела человека, молекулу гуманизированного антитела или их фрагмент связывания. Как правило, антитело представляет собой моноклональное антитело. Источник такого антитела может представлять собой человека, мышины, крысу, верблюдовых, кролика, овечьих, свиней или крупный рогатый скот, и оно может генерироваться в соответствии со способами, известными в данной области.

Как правило, IL-6а содержит, по меньшей мере, CDR антитела, которое может специфично связываться с IL-6 (например, IL-6 человека), например с сайтом II IL-6. Структура, несущая CDR или набор CDR по настоящему изобретению, может представлять собой последовательность тяжелой или легкой

цепи антитела или значительную ее часть, в которой CDR или набор CDR располагается в положении, соответствующем CDR или набору CDR переменных доменов, встречающихся в природе VH и VL антитела, кодируемым перегруппированным генами иммуноглобулина. Структуры и положения переменных доменов иммуноглобулина можно определить по ссылке Rabat, et al., 1983 (National Institutes of Health), и ее обновлениям, которые можно найти по ссылке "Rabat", с использованием любой поисковой машины в Интернете.

IL-6а, как описано в настоящем документе, как правило, представляет собой антитело, которое, как правило, содержит домен VH и/или домен VL антитела. Домен VH содержит набор CDR тяжелой цепи (CDR VH), и домен VL содержит набор CDR легкой цепи (CDR VL). Примеры таких CDR приведены в настоящем документе в примерах. Молекула антитела может содержать домен VH антитела, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH и каркас. Альтернативно или в дополнение к этому, оно может также содержать домен VL антитела, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL и каркас.

В настоящем документе описаны антагонисты IL-6, содержащие CDR1 VH, и/или CDR2 VH, и/или CDR3 VH, такие как те, которые описаны в настоящем документе, и/или CDR1 VL, и/или CDR2 VL, и/или CDR3 VL, такие как те, которые описаны в настоящем документе. IL-6а может содержать один или несколько CDR любого из антител, фрагментов или производных, описанных в настоящем документе. IL-6а может содержать набор CDR VH (например, CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH), и необязательно оно может также содержать набор CDR VL (например, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL). CDR могут быть получены от одного или нескольких антител, фрагментов или производных, описанных в настоящем документе. Например, CDR VL могут быть получены из того же антитела, что и CDR VH или из другого антитела.

Как правило, домен VH спаривается с доменом VL для получения сайта связывания антигена у антитела. Например, домен HC SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 спаривается с доменом LC SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях домен VH или VL сам по себе может использоваться в качестве IL-6а.

В некоторых аспектах IL-6а представляет собой молекулу антитела, ее фрагмент или производное, которое содержит: (i) последовательность домена VH, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичность последовательности аминокислот с доменом VH, описанным в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 37), или (ii) набор CDR VH (например, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH) из последовательности домена VH. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, ее фрагмент или производное содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, ее фрагмент или производное содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, которые коллективно отличаются от CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH SEQ ID NO: 37 не более чем на 1, не более чем на 2, не более чем на 3, не более чем на 4 или не более чем на 5 аминокислот.

Молекула антитела, ее фрагмент или производное может также необязательно содержать: (i) последовательность домена VL, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичность последовательности аминокислот с доменом VL, описанным в настоящем документе, например с доменом VL SEQ ID NO: 38; или (ii) набор CDR VL (например, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL) из домена VL. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, ее фрагмент или производное содержит CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, ее фрагмент или производное содержит CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, которые коллективно отличаются от CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL SEQ ID NO: 38 не более чем на 1, не более чем на 2, не более чем на 3, не более чем на 4 или не более чем на 5 аминокислот. Алгоритмы, которые можно использовать для вычисления процента идентичности двух последовательностей аминокислот, включают, например, BLAST, FASTA или алгоритм Смита-Вотерма, например, с использованием параметров по умолчанию.

IL-6а, как описано в настоящем документе, может содержать константные области антитела или их части, например константные области антитела человека или их части. Например, домен VL может присоединяться на своем С-конечном краю к константным доменам легкой цепи антитела, включая цепи СК или СL человека. Подобным же образом, IL-6а на основе домена VH может присоединяться на своем С-конечном краю ко всей тяжелой цепи иммуноглобулина, полученной от любого изотипа антитела или ее части (например, к домену CH1), например, IgG, IgA, IgE и IgM и из любого из подклассов изотипа, в частности IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с помощью генной инженерии для уменьшения или устранения активности ADCC.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG2. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит каркас IgG2, константную область IgG2 или область Fc IgG2, как описано в настоящем документе.

Антитела IgG2 могут существовать в трех главных структурных изоформах: IgG2-A, IgG2-B и IgG2-A/B (Wuруch J. et al. Journal of Biological Chemistry. 2008, 283:16194-16205). Эта структурная гетерогенность связана с различными конфигурациями дисульфидных связей, которые связывают плечи Fab с областью шарнира тяжелой цепи. В изоформе IgG2-A нет дисульфидных связей, связывающих плечи Fab с

областью шарнира. В изоформе IgG2-B, оба плеча Fab имеют дисульфидные связи, связывающие тяжелую и легкую цепь с областью шарнира. Изоформа IgG2-A/B представляет собой гибрид изоформ IgG2-A и IgG2-B, где только одно плечо Fab имеет дисульфидные связи, связывающие тяжелую и легкую цепь одного плеча Fab с областью шарнира. Преобразование антитела IgG2 между двумя или всеми различными структурными изоформами упоминается так же, как дисульфидный шаффлинг, он осуществляется в природе *in vivo* и *in vitro*, как для встречающихся в природе, так и для рекомбинантных антител. В результате, препараты антител IgG2 в данной области содержат гетерогенную смесь изоформ IgG2-A, IgG2-B и IgG2-A/B. Различные изоформы IgG2 могут иметь уникальные и различные функциональные свойства, такие как различия стабильности, агрегации, вязкости, связывания рецептора Fc или эффективности. Присутствие множества изоформ или повышенные уровни конкретной изоформы в препарате антитела IgG2 может отрицательно влиять на стабильность, агрегацию или эффективность.

Настоящее изобретение предлагает антитело с преимущественным существованием в основном в изоформе IgG2-A или IgG2-A/B. Антитело по настоящему изобретению не существует в изоформе IgG2-B, или оно не существует в изоформе IgG2-B в течение существенного периода времени. Таким образом, композиции и препараты, содержащие антитело по настоящему изобретению, являются менее гетерогенными, чем другие антитела IgG2, известные в данной области, и, следовательно, они являются более предпочтительными для использования в терапевтических применениях.

Композиции, содержащие антитело по настоящему изобретению, содержат в основном изоформы антитела IgG2-A и/или IgG2-A/B. В одном из вариантов осуществления композиция, содержащая антитело, описанная в настоящем документе, содержит по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% изоформ антитела IgG2-A или IgG2-A/B. В одном из вариантов осуществления композиция, содержащая антитело, описанная в настоящем документе, содержит коллективно по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% изоформ IgG2-A и IgG2-A/B. В таких вариантах осуществления композиция, содержащая антитело, описанная в настоящем документе, не содержит никакого существенного количества изоформ IgG2-B антитела. Например, композиция содержит меньше чем 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1 изоформ IgG2-B антитела.

В некоторых случаях антитело по настоящему изобретению дополнительно модифицируется с использованием способов, известных в данной области, для создания последовательности, имеющей конкретный аллотип, например аллотип, который преобладает в популяции, имеющей конкретное географическое происхождение. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи человека модифицируется для этой цели.

IL-6a может представлять собой молекулу антитела, ее фрагмент связывания или вариант, имеющий одну или несколько CDR, например набор CDR, в каркасе антитела. Например, одна или несколько CDR или набор CDR антитела (например, антитела или его фрагмента или производного, как описано в настоящем документе) может прививаться на каркас (например, на каркас человека) для получения молекул антитела. Области каркаса могут быть получены из последовательностей гена зародышевой линии человека или иметь источник, отличный от зародышевой линии.

Остатки каркаса VH и/или VL могут модифицироваться, как обсуждается и иллюстрируется в настоящем документе, например, с использованием сайт-направленного мутагенеза.

Изменения аминокислот могут осуществляться в одной или нескольких областях каркаса и/или в одной или нескольких областях CDR, полученных из антитела IL-6a, нацеленного на сайт II IL-6 (определяется в настоящем документе как "эталонное антитело против IL-6") с использованием способов и параметров, известных в данной области. Также в настоящий документ включается полученный в результате антагонист IL-6, который сохраняет связывание с сайтом II IL-6 (например, с сайтом II IL-6 человека) и, как правило, имеет, по меньшей мере, такое же связывание или повышенное сродство по сравнению с эталонным антителом против IL-6. В некоторых случаях для улучшения такого параметра, как стабильность, может вводиться изменение, которое дает в результате уменьшение сродства связывания, полученного IL-6a, по сравнению с эталонным IL-6a (например, с эталонным антителом), для создания пригодного для использования IL-6a. В некоторых вариантах осуществления, например, в некоторых случаях, в которых сравнение относится к связыванию FcRn или к фармакокинетическому (PK) параметру, такому как время полужизни в стекловидном теле, или к системному времени полужизни (например, в крови, плазме, сыворотке, лимфе, печени, почках, других тканях или телесных жидкостях), эталонное антитело может представлять собой антитело, которое не связывается специфично с IL-6.

Изменение последовательности аминокислот полипептида IL-6a может включать замещение одного или нескольких остатков аминокислот с не встречающейся в природе или нестандартной аминокислотой, модификацию одного или нескольких остатков аминокислот до не встречающейся в природе или нестандартной формы или вставку одной или нескольких не встречающихся в природе или нестандартных аминокислот в последовательность. Примеры количеств и положений изменений в последовательностях по настоящему изобретению описываются в настоящем документе в другом месте. Встречающиеся в природе аминокислоты включают 20 "стандартных" L-аминокислот, идентифицируемых как G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E по их стандартным однобуквенным кодам. Нестандартные аминокислоты включают любой другой остаток, который может вводиться в основную полипептидную цепь

или получаться в результате модификации существующего аминокислотного остатка. Нестандартные аминокислоты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Несколько встречающихся в природе нестандартных аминокислот известны в данной области, например 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 3-метилгистидин и N-ацетилсерин. Остатки аминокислот, которые дериватизируются в их N- $\alpha$ -положении, будут располагаться только на N-окончании последовательности аминокислот. Аминокислота, как правило, представляет собой L-аминокислоту. В некоторых случаях аминокислота представляет собой D-аминокислоту. Следовательно, изменение может включать модификацию L-аминокислоты до D-аминокислоты или ее замену D-аминокислотой. Метилированные, ацетилированные и/или фосфорилированные формы аминокислот также являются известными, и аминокислоты по настоящему изобретению могут подвергаться воздействию такой модификации.

Последовательности аминокислот в доменах антитела и элементах связывания по настоящему изобретению могут содержать не встречающиеся в природе или нестандартные аминокислоты, как обсуждается в настоящем документе. Нестандартные аминокислоты (например, D-аминокислоты) могут вводиться в последовательность аминокислот с использованием способов, известных в данной области, например, при синтезе молекулы или с помощью модификации или замены аминокислоты после синтеза. В некоторых случаях D-аминокислоту используют для увеличения PK II-6а.

Новые области VH или VL, несущие полученные из CDR последовательности по настоящему изобретению, могут генерироваться с использованием случайного мутагенеза одной или нескольких выбранных последовательностей нуклеиновых кислот VH и/или VL для генерирования мутаций во всем вариабельном домене. Например, можно использовать допускающую ошибки PCR (Chao et al., Nature Protocols, 1:755-768 (2006)). В некоторых вариантах осуществления замещения одной или двух аминокислот осуществляют во всем вариабельном домене или в наборе CDR. Другие способы, известные в данной области, можно использовать для генерирования мутаций, например, сайт-направленный мутагенез, как правило, в одной или нескольких CDR.

Один из способов продуцирования антитела II-6а заключается в замене домена VH, такого как описывается в настоящем документе, посредством добавления, делеции, замещения или инсерции одной или нескольких аминокислот. Измененный домен VH может объединяться с доменом VL (например, с доменом VL, описанным в настоящем документе), который может также изменяться, как описано в настоящем документе, и с использованием способов, известных в данной области. Такие измененные молекулы исследуют на их способность связываться с сайтом II-6 и, необязательно, на другие желаемые свойства, такие как повышенное сродство по сравнению с эталонной молекулой. В некоторых случаях вариант VH или домен VL может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 таких изменений (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замещений аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления II-6а по настоящему изобретению представляет собой фрагмент антитела, который связывается с сайтом II-6 и содержит сайт связывания антигена, например, может связываться с сайтом II-6. Фрагменты антитела по настоящему изобретению, как правило, получают, начиная с эталонной (исходной) молекулы антитела, такой как молекула антитела, содержащая SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42. Фрагменты антитела могут генерироваться с использованием способов, известных в данной области, таких как рекомбинантная ДНК, ферментативное расщепление (например, с использованием пепсина или папаина), химическое расщепление антитела (например, химическое восстановление дисульфидных мостиков). Фрагменты антитела, которые содержат сайт связывания антигена антитела, включают, но, не ограничиваясь этим, такие молекулы, как Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd и дисульфидно стабилизированная вариабельная область (dsFv). С помощью генной инженерии могут быть получены различные другие молекулы антитела, содержащие один или несколько сайтов связывания антигена антитела, включая, например, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>3</sub>, диатела, триотела, тетратела и миниантитела. Примеры молекул антител и способов их конструирования и использования описаны в Holliger and Hudson, 2005, Nat Biotechnol 23:1126-1136. Неограничивающие примеры фрагментов связывания представляют собой фрагмент Fab, состоящий из VL, VH, константный домен легкой цепи (CL) и константный домен 1 тяжелой цепи доменов (CH1); фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного антитела; фрагмент dAb, состоящий из домена VH или VL; выделенные области CDR; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab; одноцепочечную молекулу Fv (scFv), в которой домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который делает возможной ассоциацию двух доменов с образованием сайта связывания антигена; биспецифичный димер одноцепочечных Fv (например, как описано в WO 1993/011161) и диатела, которое представляет собой мультиспецифичный фрагмент, сконструированный с использованием слияния генов (например, как описано в WO 94/13804). Молекулы Fv, scFv или диатела могут стабилизироваться посредством введения дисульфидных мостиков, связывающих домены VH и VL. Миниантитела, содержащие scFv, соединенные с доменом CH3, также можно использовать в качестве II-6а. Другие фрагменты и производные антитела, которые можно использовать в качестве II-6а, включают Fab', который отличается от фрагмента Fab добавлением нескольких остатков аминокислот на карбоксильном окончании домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из области шарнира антитела, и Fab'-SH, который представляет собой фрагмент Fab', в котором цистеиновый

остаток (остатки) константных доменов несет свободную тиольную группу.

В некоторых случаях II-6а, который представляет собой фрагмент антитела, химически модифицируется для улучшения или введения желаемого свойства, например, с помощью РЕГирирования для увеличения времени полужизни или удерживания.

dAb (домен антитела) представляет собой малый мономерный антигенсвязывающий фрагмент у антитела (вариабельная область тяжелой или легкой цепи антитела. dAb VH встречаются в природе у верблюдовых (например, у верблюдов и у лам) и могут быть получены посредством иммунизации верблюдового с помощью целевого антигена, выделения антиген-специфичных В лимфоцитов и прямого клонирования генов dAb от индивидуальных В лимфоцитов. II-6а по настоящему изобретению может представлять собой dAb, содержащий домен VH или VL, по существу, как приводится в настоящем документе, или домен VH или VL, содержащий набор CDR, по существу, как приводится в настоящем документе.

Антитела по настоящему изобретению включают биспецифичные антитела, в которых две различные вариабельные области объединяются в одной молекуле. II-6а может вводиться как часть биспецифичного антитела, полученного с использованием способов, известных в данной области, например, приготавливаться химически или из гибридных гибридом. Такая молекула может представлять собой фрагмент биспецифичного антитела типа, обсуждаемого выше. Один из неограничивающих примеров способа генерирования биспецифичного антитела представляет собой технологию ViTE™, в которой домены связывания двух антител с различной специфичностью можно использовать и непосредственно связывать с помощью коротких гибких пептидов. Это объединяет два антитела на одной короткой полипептидной цепи. Диатела и scFv могут конструироваться без области Fc, с использованием только вариабельных доменов, потенциально уменьшая воздействия антиидиотипической реакции. Биспецифичные антитела могут конструироваться как целые IgG, как биспецифичные Fab<sub>2</sub>, как Fab'PEG, как диатела или, кроме того, как биспецифичные scFv. Кроме того, два биспецифичных антитела могут связываться с использованием рутинных способов, известных в данной области, с образованием четырехвалентных антител.

Биспецифичные диатела, в отличие от биспецифичных цельных антител, являются полезными, отчасти потому, что они могут конструироваться и экспрессироваться в *E. coli*. Диатела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антитела) с соответствующими специфичностями связывания могут легко выбираться посредством селекции с использованием фагового дисплея (WO 1994/13804) из библиотек. Если одно плечо диатела должно поддерживаться константным, например, со специфичностью, направленной на сайт II II-6, тогда может быть получена библиотека, где другое плечо изменяется и осуществляется селекция антитела с соответствующей специфичностью.

Биспецифичные цельные антитела могут быть получены с помощью альтернативных способов генной инженерии, как описано в описании в WO 1996/27011, WO 1998/50431 и WO 2006/028936.

В некоторых случаях II-6а по настоящему изобретению содержит сайт связывания антигена в молекуле, отличной от антитела, например, посредством введения одной или нескольких CDR, например набора CDR, в скелет белка, отличного от антитела, как дополнительно обсуждается ниже. В некоторых случаях CDR вводятся в скелет молекулы, отличной от антитела. Сайт связывания с сайтом II II-6 может создаваться посредством размещения CDR на скелетах белков, отличных от антитела, таких как фибронектин или цитрохром В, или посредством рандомизации или мутаций остатков аминокислот в петлях в скелете белка с целью придания специфичности связывания с сайтом II II-6. Скелеты для получения с помощью генной инженерии новых сайтов связывания в белках известны в данной области. Например, белковые скелеты для воспроизведения свойств антител описаны в WO 200034784, которая описывает белки (воспроизводящие свойства антител), которые включают домен фибронектина типа III, имеющий по меньшей мере одну рандомизированную петлю. Пригодный для использования скелет, на который должна прививаться одна или несколько CDR, например набор HCDR, может быть создан с помощью любого элемента домена суперсемейства генов иммуноглобулинов. Скелет может представлять собой белок человека или существа, отличного от человека. Преимущество скелетов белков, отличных от антитела, заключается в том, что они могут обеспечить сайт связывания антигена на скелете молекулы, которая меньше и/или проще для получения, чем, по меньшей мере, некоторые молекулы антител. Малый размер элемента связывания может придавать полезные физиологические свойства, такие как способность к проникновению в клетки, к проникновению глубоко в ткани или к достижению мишеней в других структурах или к связыванию в белковых полостях целевого антигена. Типичными являются белки, имеющие стабильную основную цепь и одну или несколько вариабельных петель, в которых последовательность аминокислот петли или петель специфично или случайным образом мутирует для создания сайта связывания антигена, который связывает целевой антиген. Такие белки включают домены связывания IgG белка А от *S. aureus*, трансферрина, тетранектина, фибронектина (например, с использованием 10-го домена фибронектина типа III), липокалинов, а также  $\gamma$ -кристаллические и другие скелеты Affilin™ (Scil Proteins, Halle, Germany). Примеры других подходов включают синтетические микроантитела на основе циклотидов - малых белков, имеющих внутримолекулярные дисульфидные связи, микропротеинов (например, Versabodies™, Amunix Inc., Mountain View, CA) и белков с повторяющимися единицами анкирина (DARPiны, например, от Molecular Partners AG, Zurich-Schlieren, Switzerland). Такие белки также включают малые, полученные с помощью генной инженерии домены белков, такие, например, как

иммунодомены (см., например, публикации патентов США №№ 2003/082630 и 2003/157561). Иммунодомены содержат по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR) антитела.

IL-6a может содержать дополнительные аминокислоты, например, для придания молекуле другой функциональной характеристики в дополнение к способности к связыванию антигена.

В некоторых случаях IL-6a несет детектируемую метку или конъюгируется с токсином или нацеливающим остатком или ферментом (например, через пептидильную связь или линкер). Например, IL-6a может содержать каталитический сайт (например, в ферментативном домене), а также сайт связывания антигена (например, сайт связывания с сайтом II IL-6), так что сайт связывания антигена связывается с антигеном и, таким образом, он нацеливает каталитический сайт на IL-6 или на комплекс IL-6/IL-6R. Каталитический сайт может в некоторых случаях дополнительно ингибировать биологическую функцию IL-6, например, посредством отщепления IL-6, IL-6R или другой молекулы, которая ассоциируется с комплексом IL-6a/IL-6.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает антитело IL-6a, которое модифицируется по сравнению с эталонным антителом для изменения, например для увеличения, уменьшения или устранения функции биологического действия IL-6a. В одном из примеров, модифицируется область Fc или исходный домен Fc заменяется модифицированным доменом Fc для изменения фармакокинетики модифицированного IL-6a по сравнению с немодифицированным предшественником. В некоторых вариантах осуществления IL-6a подвергается воздействию генной инженерии для создания каркаса IgG2. В других вариантах осуществления IL-6a находится в каркасе IgG1 или IgG2 и имеет модифицированную область Fc, которая увеличивает сродство связывания с IL-6a при pH 6,0 и не изменяет существенно сродство связывания при pH 7,0 по сравнению с исходным или другим эталонным IL-6a. В некоторых вариантах осуществления домен Fc модифицируется и IL-6a имеет уменьшенную системную аккумуляцию, уменьшенное время полужизни и/или увеличенное системное выведение по сравнению с исходным или другим эталонным IL-6a.

В некоторых вариантах осуществления антитело IL-6a модифицируется для увеличения фиксации комплемента и комплемент-зависимой цитотоксичности. В других аспектах антитело IL-6a модифицируется для увеличения способности антитела по сравнению с эталонным антителом к активации эффекторных клеток и к участию в антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC). В некоторых случаях антитела, как описано в настоящем документе, могут модифицироваться как для повышения и способности к активации эффекторных клеток, так и для участия в антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC) и для повышения их способности к фиксации комплемента и к участию в комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, модифицируются для уменьшения их способности к фиксации комплемента и к участию в комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). В других вариантах осуществления антитела модифицируются для уменьшения их способности к активации эффекторных клеток и к участию в антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC). В других вариантах осуществления антитела, как описано в настоящем документе, может модифицироваться как для уменьшения его способности к активации эффекторных клеток, так и к участию в антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC) и к уменьшению его способности к фиксации комплемента и к участию в комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

Как правило, является преимуществом исключение частой доставки дозы IL-6a, например, когда она доставляется посредством инъекции в глаз. Чтобы сделать доступной эту особенность, в определенных вариантах осуществления время полужизни в месте доставки, например в стекловидном теле, для IL-6a, как описано в настоящем документе, составляет по меньшей мере 4 дня, например по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 11 дней или по меньшей мере 14 дней. В определенных вариантах осуществления среднее время полужизни IL-6a составляет по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 25 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней или 60 дней. Способы увеличения времени полужизни антитела известны в данной области, например, как описано в патенте США № 6211315 и в международных публикациях №№ WO 1998/23289 и WO 1997/3461. В некоторых вариантах осуществления время полужизни IL-6a увеличивается в целевом месте доставки, например в стекловидном теле, по сравнению с системным временем полужизни, например с временем полужизни в крови, сыворотке, плазме, лимфе, печени, почках или в других тканях или телесных жидкостях.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает промышленное изделие, содержащее контейнер. Контейнер содержит композицию, содержащую IL-6a, как описано в настоящем документе, и вставку или этикетку для упаковки, показывающую, что композицию можно использовать для лечения расстройства, связанного с IL-6. Как правило, композиция представляет собой IL-6a в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых случаях настоящее изобретение представляет собой набор, содержащий композицию, содержащую IL-6a, как описано в настоящем документе, и инструкции для введения композиции субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

В некоторых вариантах осуществления, в которых желательным является большой размер IL-6a,

например, для увеличения удерживания IL-6а в месте доставки или вблизи него, с IL-6а может ассоциироваться остаток, который увеличивает размер, но не оказывает в значительной степени отрицательного влияния на функцию IL-6а (например, на средство связывания IL-6а с IL-6 или с комплексом IL-6/IL-6R). Например, Fab может быть получен с помощью генной инженерии таким образом, чтобы он экспрессировался в виде единых полипептидов, содержащих Fab и остаток Fc.

В некоторых вариантах осуществления, в которых желательным является относительно малый размер IL-6а, можно использовать фрагменты антитела против IL-6, например scFv или фрагмент Fab. Антитело IgG имеет размер примерно 150 кДа, Fab составляет примерно 50 кДа, и scFv составляет примерно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления IL-6а, как описано в настоящем документе, является меньшим примерно чем 50 кДа по размеру. Такой антагонист может, например, быть равным или меньшим чем 50 кДа и большим чем 10 кДа, равным или меньшим чем 50 кДа и большим чем 20 кДа или равным или меньшим чем 50 кДа и равным или большим чем 25 кДа.

В некоторых случаях стабильность антагониста IL-6, например, антитела или другого ингибитора, имеющего дисульфиды, улучшается посредством создания варианта, в котором один или несколько дисульфидных мостиков являются более стабильными, чем в исходной молекуле.

Другое преимущество определенных молекул IL-6а, описанных в настоящем документе, может представлять собой доступность эффективных молекул, имеющих размер, пригодный для использования при их способе доставки, месте доставки или режиме активности. Например, IL-6а в формате Fab можно использовать для местного нанесения. Способы генной инженерии таких молекул описываются в настоящем документе и известны в данной области.

#### **Показания/заболевание, ассоциированное с IL-6**

Заболевания, которые можно лечить с помощью IL-6а по настоящему изобретению, включают такие заболевания, при которых повышенный уровень IL-6 ассоциируется с болезненным состоянием или присутствует в качестве предпосылки болезненного состояния. Такие заболевания включают такие, при которых ангиогенез и воспаление, обусловленные IL-6, вносят вклад в патологию заболевания. Они включают заболевания, при которых уровень IL-6 повышается по сравнению с нормальными уровнями, например заболевания, при которых уровень IL-6 повышается в стекловидном теле (такие, например, как диабетический макулярный отек, диабетическая ретинопатия и увеит) или в тканях глаза. Примеры включают определенные глазные заболевания, включая, без ограничения, сухой глаз (например, болезнь сухого глаза или синдром сухого глаза), аллергический конъюнктивит, увеит, возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), диабетический макулярный отек (DME), регматогенную отслойку сетчатки (RRD), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелит зрительного нерва (NMO). Другие глазные расстройства, которые могут лечиться, включают расстройства, вызываемые травмой, такие как трансплантат роговицы, эрозия роговицы или другие такие механические травмы глаза. Соответственно, настоящее изобретение включает лечение субъекта, имеющего заболевание, связанное IL-6, с помощью IL-6а, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой воспалительное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой глаукому.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой глазную боль.

В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта также включает определение того, имеет ли субъект заболевание, ассоциированное с IL-6, и необязательно, является ли субъект стойким к другим видам лечения, отличным от ингибитора IL-6, таким как стероиды или анти-VEGF терапевтические средства.

Одна из проблем с определенными терапевтическими средствами на основе антител, которые являются эффективными в конкретном месте, таком как глаз, например в стекловидном теле, представляет собой отрицательные воздействия, которые возникают в результате системного введения. Одно из решений заключается в создании терапевтических средств, которые могут доставляться локально, в отличие от системной доставки, как иллюстрируется молекулами, описанными в настоящем документе. Поскольку некоторые терапевтические средства, которые доставляются локально, например, в стекловидное тело, будут, до некоторой степени, распространяться системно, является преимущественной разработкой молекулы, которая будет иметь относительно быстрый системный оборот. Авторы настоящей заявки получили с помощью генной инженерии примеры антител против IL-6, разработанных для быстрого системного оборота, например, по сравнению с исходной молекулой или с эталонным антителом. Это осуществляется посредством мутации домена Fc для модификации связывания молекулы FcRn, например, для уменьшения медируемого FcRn рециклирования IL-6а.

**Диабетический макулярный отек (DME).**

Диабетический макулярный отек (DME) включает окклюзию кровеносных сосудов сетчатки глаза и утечку из них, вызывая уменьшение остроты зрения и потенциальную слепоту. Стандартные виды лечения для DME включают локальное введение стероидов или антител анти-VEGF. Однако многие пациенты являются невосприимчивыми к этим видам терапии. Патогенез диабетического макулярного отека включает компоненты ангиогенеза, воспаления и оксидативного стресса. IL-6 индуцируется гипоксией и

гипергликемией и может увеличить сосудистое воспаление, проницаемость сосудов и патологический ангиогенез. IL-6 может непосредственно индуцировать экспрессирование VEGF и может способствовать неоваскуляризации хороидеи на животных моделях. У пациентов с DME, глазные уровни IL-6 положительно коррелируют с толщиной желтого пятна и тяжестью заболевания. Уровни IL-6 явно являются повышенными у пациентов, которым не помогает терапия анти-VEGF, в то же время они понижаются у пациентов, восприимчивых к анти-VEGF.

Соответственно, введение IL-6а, как описано в настоящем документе, является пригодным для использования при лечении диабетиков в сочетании с терапевтическими средствами анти-VEGF или в качестве альтернативы лечению анти-VEGF, включая пациентов, которые невосприимчивы к терапии анти-VEGF. Лечение макулярного отека с помощью IL-6а может также улучшить безопасность посредством устранения необходимости в полном ингибировании любого механизма для ингибирования патологии, сохраняя, таким образом, некоторые из желательных физиологических ролей каждого цитокина. Соответственно, локальное лечение IL-6а в сочетании с ингибированием VEGF может уменьшить частоту дозирования и уменьшить отрицательные воздействия лечения.

При DME имеются положительные корреляции между уровнями IL-6 в стекловидном теле и как тяжестью заболевания, так и невосприимчивости субъектов к VEGF. Соответственно, IL-6а, как описано в настоящем документе, можно использовать для лечения субъектов с DME, которые являются невосприимчивыми к стероидной терапии, анти-VEGF терапии или как к той, так и к другой. В некоторых случаях IL-6а используется в сочетании с анти-VEGF терапией или стероидной терапией, например, для лечения DME.

IL-6а, описанный в настоящем документе, можно также использовать для лечения расстройств, таких как рак, например рак простаты, лейкемия, множественная миелома, воспалительного (такого как хронические воспалительные пролиферативные заболевания) и аутоиммунные заболевания, например ревматоидный артрит, болезнь Кастлемена (гигантская или ангиофолликулярная гиперплазия лимфоузлов, лимфоидная гамартома, ангиофолликулярная гиперплазия лимфоузлов), ювенильный идиопатический артрит (включая полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит и системный ювенильный идиопатический артрит), болезнь Стилла (охватывающую ювенильный идиопатический артрит и болезнь Стилла зрелого возраста), болезнь Стилла зрелого возраста, амилоидоз с отложением амилоида А, ревматическая полимиалгия, временно ослабевающий серонегативный симметричный синовит с отеком с возникновением ямки при надавливании, спондилоартриты, болезнь Бехчета (включая лечение ее глазных проявлений), атеросклероз, псориаз, системная красная волчанка, полимиозит (воспалительная миопатия), рецидивирующий полихондрит, приобретенная гемофилия А, множественный склероз, анемия воспаления и болезнь Крона.

Антагонисты IL-6 также являются пригодными для использования при лечении определенных неврологических заболеваний, например депрессии и болезни Альцгеймера.

Другие заболевания, которые можно лечить с помощью IL-6а, описанного в настоящем документе, включают, без ограничения, системный склероз, болезнь Такаясу, гигантоклеточный артериит, заболевание реакция "трансплантат против хозяина" и периодический синдром, ассоциированный с рецепторами TNF (TRAPS).

Дозирование.

Антитело против IL-6 или его фрагмент может вводиться субъекту (например, пациенту), который экспрессирует, например, аномально высокие уровни IL-6. Антитело или его фрагмент может вводиться один раз или может вводиться многократно. Антитело может вводиться, например, от трех раз в день до одного раза каждые шесть месяцев или больше. Введение может осуществляться по графику, например, три раза в день, два раза в день, один раз в день, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждый месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца и один раз каждые шесть месяцев. Антитело или его фрагмент может вводиться непрерывно с помощью мининасоса или другого способа, такого как имплантируемая капсула с медленным высвобождением, или с помощью инкапсулированной клетки, продуцирующей антитело или его фрагмент. Антитело или его фрагмент может вводиться мукозальным, буккальным, интраназальным, ингаляционным, внутривенным, подкожным, внутримышечным, парентеральным, интраокулярным или внутриопухолевым способом. Антитело или его фрагмент может вводиться один раз, по меньшей мере два раза или в течение, по меньшей мере, периода времени до тех пор, пока состояние вылечивается, облегчается или излечивается полностью. Антитело или его фрагмент, как правило, будет вводиться все время пока присутствует это состояние. Антитело или его фрагмент, как правило, будет вводиться в качестве части фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. Дозировка антитела, как правило, будет находиться в пределах от 0,1 до 100 мг/кг, от 0,5 до 50 мг/кг, от 1 до 20 мг/кг и от 1 до 10 мг/кг. Концентрация антитела или его фрагмента в сыворотке может быть измерена с помощью любого пригодного для использования способа. Одна из особенностей определенных соединений, описанных в настоящем документе, заключается в том, что они требуют относительно нечастого дозирования, например один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, один раз каждые четыре недели, один раз каждые две недели, один раз каждые 8 недель, один раз каждые 12 недель, один раз каждые 16 недель,

один раз каждые 32 недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца или один раз в шесть месяцев. В некоторых случаях соединение вводится на основании потребности в нем, и это определяется, например, состоянием субъекта. Особенностью антагонистов IL-6, описанных в настоящем документе, является то, что они делают возможным относительно нечастое дозирование в сочетании с лучшей эффективностью, что достигается, по меньшей мере частично, с помощью низкой скорости отсоединения после связывания с IL-6 и с помощью способности к доставке относительно высокой концентрации соединения.

В некоторых случаях IL-6а вводится в виде монотерапии. В других вариантах осуществления IL-6а вводится одновременно с метотрексатом или другим модифицирующим заболевание противоревматическим лекарственным средством.

Генерация антител.

Антитело IL-6а или его производное или фрагмент может продуцироваться с использованием способов, известных в данной области, таких как методика моноклональных антител (например, см. Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495). Могут использоваться также другие технологии продуцирования моноклональных антител, такие как вирусное или онкогенное преобразование В лимфоцитов.

Химерные или гуманизированные антитела могут приготавливаться на основе последовательности моноклональных антител мышинных, полученных с использованием способов, известных в данной области. ДНК, кодирующая иммуноглобулины с тяжелыми и легкими цепями, может быть получена из гибридомы мышинных, представляющей интерес, и преобразована с помощью генной инженерии таким образом, чтобы она содержала последовательности иммуноглобулинов, отличные от мышинных (например, человека), с использованием стандартных технологий молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела, переменные области мышинных могут связываться с константными областями человека с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 4816567). Для создания гуманизированного антитела области CDR мышинных могут вставляться в каркас человека с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 5225539 и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370).

В некоторых вариантах осуществления IL-6а, описанный в настоящем документе (например, антитело анти-IL-6 или его производное или фрагмент), может специфично связываться с IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления IL-6а может специфично связываться с сайтом II IL-6 (например, с сайтом II IL-6 человека).

В некоторых вариантах осуществления антитело против IL-6а представляет собой моноклональное антитело человека. Такие антитела могут генерироваться с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих части иммунной системы человека вместо системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают "мыши с Ig человека", такие как HuMAb Mouse® и KM Mouse® (см., например, патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; патент США № 5545807; публикации PCT №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962; публикацию № WO 01/14424).

В другом аспекте антитела анти-IL-6 человека могут быть получены с использованием мыши, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, таких как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши описаны подробно в публикации PCT № WO 02/43478.

Другие трансгенные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, являются доступными в данной области и могут использоваться для выращивания антитела IL-6а. Например, может использоваться альтернативная трансгенная система, упоминаемая как Xenomouse™ (Abgenix, Inc.); такие мыши описываются, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963. Более того, трансхромосомные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, являются доступными в данной области и могут использоваться для выращивания антитела IL-6а. Например, мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, описываются в Tomizuka et al. (2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727). Моноклональные антитела человека могут также быть получены с использованием мышей SCID, у которых иммунные клетки человека восстановлены таким образом, что реакция антитела человека может генерироваться при иммунизации. Такие мыши описываются, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767.

Библиотеки фаговых дисплеев.

В некоторых случаях антитело IL-6а или его производное или фрагмент продуцируется в способе, который включает синтез библиотеки антител человека с использованием фага, скрининг библиотеки с помощью IL-6, например IL-6 человека или его фрагмента, выделение фага, который связывает IL-6, и получение антитела от этого фага.

Рекомбинантное антитело IL-6а человека может также быть выделено посредством скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител. Как правило, библиотека представляет собой библиотеку фагового дисплея scFv, генерируемую с использованием сДНК VL и VH человека, полученную

из mRNA, выделенную из В лимфоцитов. Способы получения и скрининга таких библиотек известны в данной области. Наборы для генерирования библиотек фаговых дисплеев являются коммерчески доступными (например, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; и Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612). Другие способы и реагенты, которые можно использовать при генерировании и скрининге библиотек дисплеев антител, известны в данной области (см., например, патент США № 5223409; публикации PCT №№ WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid. Res.* 19:4133-4137 (1991); и Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), все они включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

В примере выделения и продуцирования антител против IL-6 человека с желаемыми характеристиками сначала используют антитело против IL-6 человека, чтобы выбрать последовательности тяжелых и легких цепей человека, имеющее сходную активность связывания по отношению к IL-6, с использованием способов импринтинга эпитопа, описанные в публикации PCT № WO 93/06213, включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Библиотеки антител, используемые в этом способе, как правило, представляют собой библиотеки scFv, приготовленные и просмотренные, как описано в публикации PCT № WO 92/01047; McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); и Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), все они включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

После выбора начальных доменов VL и VH человека, осуществляют эксперименты "комбинирования для получения наилучших результатов", при которых различные пары выбранных вначале сегментов VL и VH просматривают относительно связывания IL-6, чтобы выбрать предпочтительные парные сочетания VL/VH. Для выбора желательных особенностей IL-6а сегменты VL и/или VH выбранной пары могут мутировать случайным образом. Это созревание сродства *in vitro* может осуществляться, например, посредством амплификации доменов VH и VL с использованием праймеров PCR комплементарных к CDR одного или обоих выбранных доменов VH и VL, эти праймеры содержат неупорядоченную смесь из четырех нуклеотидных оснований в определенных положениях, так что полученные в результате продукты PCR кодируют сегменты VH и VL, в которые вводятся случайные мутации в VH и/или VL. Такие сегменты VH и VL со случайными мутациями могут повторно просматриваться на связывание с IL-6, например с сайтом II IL-6.

После скрининга и выделения антитела IL-6а из рекомбинантной библиотеки дисплеев иммуноглобулинов нуклеиновые кислоты, кодирующие выбранное антитело, могут извлекаться из упаковки дисплея (например, из генома фага) и субклонироваться в другие векторы экспрессии с использованием рекомбинантных технологий ДНК, известных в данной области. Такие антитела могут дополнительно подвергаться воздействию манипуляций для получения фрагмента антитела, такого как описано в настоящем документе.

### **Фармакокинетика (PK)**

Исследование PK может осуществляться с использованием способов, описанных в настоящем документе, и/или способов, известных в данной области. Один из барьеров для определений, требующих использование животного, например определение PK, заключается в том, что IL-6 человека имеет гомологию меньше 50% с другими животными, обычно используемыми для такого исследования. По этой причине один из способов исследования PK заключается в использовании трансгенной мыши, экспрессирующей IL-6 человека. В некоторых вариантах осуществления для определения PK используют примата иного, чем человек.

В некоторых вариантах осуществления антитело анти-IL6 мутирует для изменения его PK, например, посредством изменения чувствительности связывания FcRn к pH. Способ получения таких мутаций описан в примерах. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления IL-6а имеет измененную системную PK по сравнению с исходным IL-6а или эталонной молекулой. В некоторых случаях PK в стекловидном теле не изменяется или улучшается. В некоторых вариантах осуществления IL-6а имеет пониженную системную PK (например, уменьшенное время полужизни и/или увеличенное выведение, например, как анализируется в циркуляторной жидкости, такой как кровь, плазма, лимфа или сыворотка) по сравнению с исходным IL-6а или эталонной молекулой.

### **Модели для исследования антагониста IL-6**

Антагонисты IL-6 могут исследоваться на моделях заболевания относительно доставки, ассоциированного с IL-6, в частности относительно эффективности лечения и ограничения вредных воздействий на преимущественные свойства IL-6. Например, увеит может исследоваться на экспериментальной модели аутоиммунного увеита на крысах или мышах (Caspi, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1873; Agarwal et al., 900:443-69, 2012) с иммунизацией с использованием межфоторецепторного ретинол-связывающего белка (IRBP) в полном адьюванте Фрейнда (CFA). Другие модели включают модели, известные в данной области, для увеита, вызываемого дендритными клетками, адаптивного переноса культивированных эф-

факторных Т лимфоцитов, спонтанного EAU у IRBP TCR Tg мышей, эндотоксин-индуцированного увеита, аутоиммунного увеоретинита (Haruta et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:3264 (2011); Yoshimura et al., *Rheumatology* 48:347-354 (2009)).

Другие модельные системы, которые могут использоваться для исследования воздействий IL-6a при лечении заболевания, ассоциированного с IL-6, представляют собой, например, модель неоваскуляризации хороидеи (CNV) (Izumi-Nagai et al., *Am J. Pathol.* 170:6 (2007); Krzystolik et al., *Arch Ophthalmol* 120:338 (2002) ) и диабетические модели, такие как описано в Kern et al. (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (P01 DK57733), Update Report (September 2001 - January 2004)).

Животные модели, пригодные для использования при исследовании IL-6a при ревматоидном артрите, известны в данной области, см., например, Asquith et al. (*Eur J. Immunol* 39:2040-4 (2009)) и Kollias et al. (*Ann Rheum Dis* 70:1357-62 (2011)).

Модели CNV являются репрезентативными, например, для состояний AMD и DME человека. Модели неоваскуляризации сетчатки являются полезными, например, для исследования ишемических ретинопатий, например диабетической ретинопатии или ретинопатии недоношенных. Различные модели неоваскуляризации хороидеи и сетчатки являются известными в данной области (см., например, Grossniklaus, H.E. et al. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Nov; 29 (6):500-19. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003, Epub 2010 May 19; Saisin, Y. et al. (2003) *Journal of Cellular Physiology*, 195:241-248; Takahashi, K. et al. (2003) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(1):409-415; Lima Silva, R. et al. (2007) *FASEB Journal*, 21:3219-3230; Tobe et al. (1998) *American Journal of Pathology*, 153(5):1641-1646; Dong, A. et al. (2011) *PNAS*, 108(35): 14614-14619; Dong et al. (2009) *J. Cell. Physiol.* 219:544-552; Smith, L.E. et al. 1994 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48 (9):4335-4341), и они могут использоваться для исследования эффективности IL-6a.

Неоваскуляризация хороидеи (CNV) может индуцироваться, например, лазерами, светом, хирургическим вмешательством или генетическими модификациями. Модели индуцируемой кислородом неоваскуляризации сетчатки известны в данной области и описываются, например, в Smith, L.E. et al. 1994 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48 (9):4335-4341.

Может также использоваться модель ишемии/реперфузии. См., например, Zheng, L. et al. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48, no. 1, pp. 361-367, 2007. Например, в день 1 игла номер 30, присоединенная к мешку с жидкостью, вставляется в роговицу анестезированных мышей, и внутриглазное давление (IOP) повышается приблизительно до 120 мм рт.ст. для генерирования ишемии. Через 30-90 мин иглу удаляют, IOP нормализуется и происходит восстановление кровотока в сетчатке. Экспрессирование маркеров воспаления, включая TNF- $\alpha$  и ICAM-1, может оцениваться с помощью анализа вестерн-блот и qPCR в дни 2-6. В дополнение к этому потери ганглионных клеток могут оцениваться с помощью гистологии в дни 3-14, и дегенерация капилляров измеряется с помощью методики трипсинового переваривания в дни 10-14. Для терапевтических исследований исследуемое изделие (например, 1 мкл соответствующей концентрации, например 20 мг/мл, IL-6a) вводят в виде инъекции в стекловидное тело либо незадолго до индукции ишемии, либо после этого.

Сочетанная терапия.

В некоторых вариантах осуществления IL-6a вводится в сочетании со вторым терапевтическим средством. Например, IL-6a вводится в режиме лечения, который включает ингибитор VEGF, такой, например, как ранибузумаб. В некоторых вариантах осуществления IL-6a вводится в режиме лечения, который включает ингибитор PDGF, такой, например, как антитело анти-PDGF или антитело анти-рецептор PDGF (например, иматиниб). В некоторых вариантах осуществления IL-6a вводится в сочетании с ингибитором пути комплемента, например с лампализумабом (ингибитор фактора D) или ингибитором C5.

Доставка антагониста IL-6.

Антагонист IL-6 или композиция, описанная в настоящем документе, может доставляться локально, либо в прямом контакте, либо вблизи клетки или ткани, на которую нацелено ингибирование IL-6. Неограничивающие примеры таких способов доставки включают инъекцию, вливание или имплантацию вещества, содержащего антагонист IL-6.

В некоторых вариантах осуществления IL-6a или композиция вводится интраокулярно, например, внутрь стекловидного тела, например, с помощью инъекции в стекловидное тело, офтальмологической вставки или генетической доставки.

В некоторых вариантах осуществления композиция IL-6a вводится в виде офтальмологического препарата. Способы могут включать введение композиции IL-6a и офтальмологически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления офтальмологический препарат представляет собой жидкость, полутвердое вещество, вставку, пленку, микрочастицу или наночастицу. Композиция IL-6a может вводиться, например, местным образом или посредством инъекции (например, инъекции в стекловидное тело).

В некоторых вариантах осуществления композиция IL-6a приготавливается для введения в стекловидное тело.

В некоторых вариантах осуществления композиция IL-6a приготавливается для местного введения,

например, в глаз. Препарат для местного введения может представлять собой жидкий препарат или полутвердое вещество, например препарат для местного введения может включать водный раствор, водную суспензию, мазь или гель. Офтальмологический препарат II-ба может наноситься местным образом на переднюю часть глаза, под верхнее веко, на нижнее веко и в свод конъюнктивы. Как правило, офтальмологический препарат является стерильным.

Офтальмологический препарат II-ба может содержать один или несколько фармацевтических наполнителей, пригодных для приготовления офтальмологических препаратов. Примеры таких наполнителей представляют собой консервирующие агенты, буферные агенты, хелатирующие агенты, агенты антиоксиданты и соли для регулировки осмотического давления. Офтальмологические препараты, включая как мази, так и суспензии, как правило, имеют вязкость, которая соответствует выбранному способу введения. В некоторых вариантах осуществления офтальмологический препарат имеет вязкость примерно от 1000 примерно до 30000 сП.

В некоторых вариантах осуществления препарат представляет собой жидкий препарат, содержащий полимер. Такой полимер может использоваться для улучшения биологической доступности, повышения вязкости или для уменьшения оттока из глаза жидкого препарата. Пригодные для использования полимеры включают, но не ограничиваясь этим, полимеры, описанные в Wagh et al. (*Asian. J. Pharm.*, 2:12-17, 2008). В неограничивающих примерах полимер представляет собой натрий гуалуроназу, хитозан, циклодекстрин (например, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин), полигалактуроновую кислоту, ксилоглюкан, ксантановую смолу, геллановую камедь, тиомер, сложный поли(ортоэфир) (например, Einmahl, *Adv Drug Deliv Rev* 53:45-73, 2001) или полисахарид из семян тамаринда (например, Ghelardi et al., *Antimicrob Agents Chemother* 48:3396-3401, 2004).

В некоторых вариантах осуществления препарат, содержащий композицию II-ба для офтальмологической доставки, может содержать одно или несколько веществ из поверхностно-активных веществ, вспомогательных веществ, буферов, антиоксидантов, регуляторов тоничности, консервантов (например, EDTA, БАК (бензалкония хлорида), хлорита натрия, пербората натрия, поликватерниума-1), загустителей или модификаторов вязкости (например, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, гликоль 400, пропиленгликоль, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропил-гуар, гиалуроновую кислоту и гидроксипропилцеллюлозу) и т.п. Добавки в препарате могут включать, но не ограничиваясь этим, хлорид натрия, бикарбонат натрия, сорбиновую кислоту, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, касторовое масло и перборат натрия.

В некоторых вариантах осуществления в композиции используется очищенная или деионизованная вода. pH может регулироваться посредством добавления любых физиологически и офтальмологически приемлемых кислот, оснований или буферов для регулировки pH в пределах примерно от 5,0 до 8,5, например pH 7,0, pH 7,3, pH 7,4 или pH 7,5. Примеры офтальмологически приемлемых кислот включают уксусную, борную, лимонную, молочную, фосфорную, хлористоводородную кислоту и т.п., примеры оснований включают гидроксид натрия, фосфат натрия, борат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, лактат натрия, трометамин, трисгидроксиметиламинометан и т.п. Примеры солей и буферов, которые можно использовать в препарате, включают цитрат/декстрозу, бикарбонат натрия, хлорид аммония и смеси рассмотренных выше кислот и оснований.

В некоторых вариантах осуществления осмотическое давление офтальмологической композиции может составлять примерно от 10 примерно до 400 мОсМ, например от 200 до 400 мОсМ или от 220 до 370 мОсМ. Как правило, осмотическое давление может регулироваться с использованием физиологически и офтальмологически приемлемых солей или наполнителей. В некоторых вариантах осуществления, в препарат вводится хлорид натрия, например, хлорид натрия присутствует в препарате при концентрации в пределах от 0,01 до 1 мас.% или от 0,05 до 0,45 мас.% по отношению к общей массе композиции. Эквивалентные количества одной или нескольких солей, состоящих из катионов, таких как калий, аммоний и т.п., и анионов, таких как хлорид, цитрат, аскорбат, борат, фосфат, бикарбонат, сульфат, тиосульфат, бисульфат, бисульфат натрия, аммоний сульфат и т.п., также можно использовать в дополнение к хлориду натрия или вместо него для получения осмоляльностей в желаемом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления сахар, такой как маннитол, декстроза, сорбитол, глюкоза и т.п., также используется для регулировки осмоляльности.

В некоторых вариантах осуществления способы включают формирование или доставку депо агента в контакте с наружной поверхностью глаза. Депо относится к источнику агента, который не удаляется быстро посредством слез или других механизмов очистки глаза. Это делает возможным непрерывное продолжительное присутствие высоких концентраций агента в жидкости на наружной поверхности глаза после единственного нанесения. В некоторых вариантах осуществления депо может удерживаться до восьми часов или более. В некоторых вариантах осуществления депо офтальмологического препарата включает, но не ограничивается этим, водные полимерные суспензии, мази и твердые вставки.

В некоторых вариантах осуществления полутвердая композиция представляет собой жидкий препарат, вязкость которого увеличивается при нанесении на глаз, как правило, благодаря присутствию полимера в жидком препарате, для которого повышение вязкости происходит при изменении температуры, pH или концентрации электролита. Полимер может представлять собой, например, ацетатфталат целлю-

лозы, полиакриловую кислоту, желатин, гуарановую камедь, гиалуроназу, хитозан, соли альгиновой кислоты (например, альгинат натрия) или блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида (например, Pluronic®, BASF; полуксамер. В некоторых вариантах осуществления полиакриловая кислота представляет собой поперечно-сшитую акриловую кислоту (например, Carbopol®). В некоторых вариантах осуществления полутвердая композиция содержит смесь карбопола и блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида; смесь метилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы или смесь полиэтиленгликоля и блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида.

В некоторых вариантах осуществления офтальмологический препарат, содержащий ПЛ-6а, представляет собой мазь или гель. В некоторых вариантах осуществления офтальмологический препарат представляет собой несущую среду для доставки на основе масла. Например, препарат может содержать петролейную или ланолиновую основу, к которой добавляется композиция ПЛ-6а (например, при 0,1-2%) и наполнители. Распространенные основы могут включать, но не ограничиваясь этим, минеральное масло, вазелин и их сочетания. В некоторых вариантах осуществления мазь наносится в виде ленты на нижнее веко.

В некоторых случаях офтальмологическая композиция представляет собой офтальмологическую вставку. В некоторых вариантах осуществления композиция вводится в стекловидное тело с помощью офтальмологической вставки.

Например, офтальмологическая вставка является биологически инертной, мягкой, биоэродируемой, вязкоупругой, стабильной при стерилизации после экспонирования для терапевтических агентов, стойкой к инфекциям от воздушных бактерий, биоразлагаемой, биологически совместимой и/или вязкоупругой. В некоторых вариантах осуществления вставка содержит офтальмологически приемлемую матрицу, например полимерную матрицу. Матрица, как правило, представляет собой полимер, и композиция ПЛ-6а диспергируется в матрице или связывается с полимерной матрицей. В некоторых вариантах осуществления агент медленно высвобождается из матрицы посредством растворения или гидролиза ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления полимер является биоразлагаемым (растворимым), и его скорость растворения может контролировать скорость высвобождения агента, диспергированного в нем. В другой форме полимерная матрица представляет собой биodeградируемый полимер, который разрушается, например, посредством гидролиза, с высвобождением при этом агента, связанного с ним или диспергированного в нем. В других вариантах осуществления матрица и агент могут быть окружены дополнительным полимерным покрытием для дополнительного контроля высвобождения. В некоторых вариантах осуществления вставка содержит биodeградируемый полимер, такой как поликапролактон (PCL), сополимер этилен/винилацетат (EVA), полиалкилцианоакрилат, полиуретан, нейлон или поли(dl-лактид-со-гликолид) (PLGA) или сополимер любых из них. В некоторых случаях агент диспергируется в материале матрицы или диспергируется в композиции мономеров, используемых для получения материала матрицы, перед полимеризацией. В некоторых вариантах осуществления количество агента составляет примерно от 0,1 примерно до 50% или примерно от 2 примерно до 20%. Может использоваться биodeградируемая или биоразлагаемая полимерная матрица, так что использованная вставка не должна удаляться из глаза. Когда биodeградируемый или биоразлагаемый полимер деградирует или растворяется, агент высвобождается.

В других вариантах осуществления офтальмологическая вставка содержит полимер, включая, но не ограничиваясь этим полимеры, описанные в Wagh, et al., "Polymer used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian. J. Pharm., pages 12-17 (January 2008), которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления вставка содержит полимер, выбранный из поливинилпирролидона (PVP), полимера или сополимера акрилата или метакрилата (например, семейство полимеров Eudragit® от Rohm или Degussa), гидроксиметилцеллюлозы, полиакриловой кислоты, дендримеров поли(амидамина), поли(диметилсилоксана), полиэтиленоксида, поли(лактид-со-гликолида), поли(2-гидроксиэтилметакрилата), поливинилового спирта) или поли(пропиленфумарата). В некоторых вариантах осуществления вставка содержит Gelfoam®. В некоторых вариантах осуществления вставка представляет собой конъюгат полиакриловой кислоты и 450 кДа цистеина.

Вставка может содержать сердцевину, которая содержит композицию ПЛ-6а, и наружную трубку (например, как описано в публикации патента США № 20040009222). В некоторых случаях наружная трубка может быть проницаемой, полупроницаемой или непроницаемой для лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления сердцевина содержит полимерную матрицу, которая не оказывает значительного воздействия на скорость высвобождения композиции ПЛ-6а. В некоторых случаях наружная трубка, полимерная матрица сердцевины или как то, так и другое являются биоразлагаемыми. Совместно экструдированный продукт может сегментироваться в виде устройств для доставки лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления устройство не имеет покрытия, так что соответствующие его края являются открытыми, или это устройство имеет покрытие, например слой, который является проницаемым для композиции ПЛ-6а, полупроницаемым для композиции ПЛ-6а или биоразлагаемым. В определенных вариантах осуществления композиция ПЛ-6а и по меньшей мере один полимер смешиваются в форме порошка.

В некоторых вариантах осуществления офтальмологическая композиция представляет собой офтальмологическую пленку. Полимеры, пригодные для использования в таких пленках, включают, но не ограничиваясь этим, полимеры, описанные в Wagh, et al. (выше). В некоторых вариантах осуществления пленка представляет собой мягкую контактную линзу, например линзу, состоящую из сополимеров N,N-диэтилакриламида и метакриловой кислоты, поперечно-сшитых с помощью этиленгликоля диметакрилата.

В определенных вариантах осуществления ИЛ-ба находится во вставке, которая имеет трубчатую форму, и она может быть сегментированной.

В некоторых вариантах осуществления композиция ИЛ-ба приготавливается в терапевтически эффективном количестве, покрытом полимерной матрицей или диспергированном в ней, так что композиция ИЛ-ба находится в форме гранул или частиц. В некоторых вариантах осуществления композиция ИЛ-ба высвобождается из препарата в качестве лекарственного средства из гранул, растворяется в матрицу или внутри нее, диффундирует через матрицу и высвобождается в окружающую физиологическую жидкость. В некоторых вариантах осуществления скорость высвобождения ограничивается, прежде всего, скоростью растворения композиции ИЛ-ба из гранул/частиц в матрицу; стадии диффузии через матрицу и диспергирования в окружающую жидкость, в основном, не являясь ограничивающими скорость высвобождения. В определенных вариантах осуществления полимерная матрица не является биоразлагаемой, в то время как в других вариантах осуществления она является биоразлагаемой. Иллюстративные неразлагаемые биологически полимерные матрицы могут формироваться из полиуретана, полисиликона, поли(этилен-со-винилацетата) (EVA), поливинилового спирта и их производных и сополимеров. Иллюстративные биоразлагаемые полимерные матрицы могут формироваться из полиангирида, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, сложного полиортоэфира, полиалкилцианоакрилата и их производных и сополимеров.

В некоторых случаях композиция ИЛ-ба приготавливается из коллагенового материала. Например, вставка может представлять собой вставку с растворимым офтальмологическим лекарственным средством (например, полимерную овальную пленку, которая может вводиться в верхний конъюнктивальный мешок для доставки лекарственного средства; эллиптическую вставку, такую как OCUSERT® (пилокарпиновую глазную терапевтическую систему, разработанную Alza Corporation), которая изготовлена из этилена-винилацетата; Lacrisert®, вставку в форме стержня, изготовленную из целлюлозы; New Ophthalmic Drug Delivery Systems (NODS), изготовленную из поли(винилового спирта); или такие вставки, как описано в Fabrizio (Adv Drug Deliv Rev 16: 95-106, 1998). В некоторых случаях вставка содержит коллаген, желатин или полимер, где полимер выбран из поликапролактона (PCL), сополимера этилен/винилацетат (EVA), полиалкилцианоакрилата, полиуретана, нейлона, поли(-со-гликолида) (PLGA) или сополимера любых из них. В некоторых случаях вставку имплантируют под верхнее веко. В некоторых случаях вставку имплантируют в задний сегмент глаза, в хориоидальное пространство или в склеру. В некоторых вариантах осуществления вставку имплантируют в стекловидное тело или под сетчатку. В некоторых вариантах осуществления вставку вводят под сетчатку с помощью инъекции. Способы введения и технологии их приготовления приведены в Remington's: The Practice of Science of Pharmacy, 20<sup>th</sup> edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2006), которые включаются в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

В других dl-лактид вариантах осуществления вставка, содержащая композицию ИЛ-ба, обеспечивает замедленное высвобождение агента в стекловидном теле глаза. Как используется в настоящем документе "замедленное высвобождение" означает, что композиция высвобождает агент в течение продолжительного периода времени контролируемым образом. В некоторых вариантах осуществления вставка высвобождает агент при такой скорости, что концентрация агента в водном растворе остается меньшей, чем концентрация агента в стекловидном теле во время высвобождения. В некоторых вариантах осуществления концентрация водного раствора агента составляет примерно от 0,002 примерно до 0,01 мкг/мл или примерно от 0,01 примерно до 0,05 мкг/мл или меньше примерно чем 0,05 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агент высвобождается при скорости примерно от 1 примерно до 50 мкг/день или примерно от 1 примерно до 10 мкг/день. В некоторых вариантах осуществления вставка дополнительно содержит дополнительный терапевтический агент, как подробно описано выше, например флюоцинолон ацетонид (такой как находится в офтальмологической вставке Retisert®).

В некоторых вариантах осуществления офтальмологическая композиция содержит микросферы или наночастицы. В некоторых вариантах осуществления микросферы содержат желатин. В некоторых вариантах осуществления микросферы вводятся посредством инъекции в задний сегмент глаза, в хориоидальное пространство, в склеру, в стекловидное тело или под сетчатку. В некоторых вариантах осуществления микросферы или наночастицы содержат полимер, включая, но не ограничиваясь этим, полимеры, описанные в Wagh, et al. (Asian. J. Pharm. 2:12-17, 2008). В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой хитозан, поликарбоновую кислоту, такую как полиакриловая кислота, частицы альбумина, сложные эфиры гиалуроновой кислоты, полиитаконовую кислоту, поли(бутил)цианоакрилат, поликапролактон, поли(изобутил)капролактон, поли(молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) или поли(молочную кислоту). В некоторых вариантах осуществления микросферы или наночастицы содержат

твердые липидные частицы.

В некоторых вариантах осуществления композиция II-6a содержит ионообменную смолу. В некоторых вариантах осуществления ионообменная смола представляет собой неорганический цеолит или синтетическую органическую смолу. В некоторых вариантах осуществления ионообменная смола включает, но не ограничиваясь этим, смолы, описанные в Wagh, et al. выше, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления ионообменная смола представляет собой частично нейтрализованную полиакриловую кислоту.

Композиция II-6a может быть получена в виде водной полимерной суспензии. В некоторых вариантах осуществления композиция II-6a или полимерный суспендирующий агент суспендируется в водной среде (например, имеющей свойства, как описано выше). Примеры полимерных суспендирующих агентов включают, но не ограничиваясь этим, декстраны, полиэтиленгликоли, поливинилпирролидон, полисахаридные гели, Gelrite®, полимеры целлюлозы, подобные гидроксипропилметилцеллюлозе, и карбоксисодержащие полимеры, такие как полимеры или сополимеры акриловой кислоты, а также другие полимерные смягчительные средства. В некоторых вариантах осуществления полимерный суспендирующий агент представляет собой набухающий в воде водонерастворимый полимер, в частности поперечно-сшитый карбоксисодержащий полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный суспендирующий агент содержит по меньшей мере примерно от 90 примерно до 99,9% или примерно от 95 примерно до 99,9 мас.% по отношению к общей массе присутствующих мономеров одного или нескольких карбоксисодержащих моноэтиленненасыщенных мономеров. В некоторых вариантах осуществления карбоксисодержащий моноэтиленненасыщенный мономер включает акриловую кислоту, метакриловую кислоту, этакриловую кислоту, метилакриловую кислоту (кротоновую кислоту), цис- $\alpha$ -метилкротоновую кислоту (ангеликовую кислоту), транс- $\alpha$ -метилкротоновую кислоту (тиглиновую кислоту),  $\alpha$ -бутилкротоновую кислоту,  $\alpha$ -фенилакриловую кислоту,  $\alpha$ -бензилакриловую кислоту,  $\alpha$ -циклогексилакриловую кислоту, фенилакриловую кислоту (коричную кислоту), кумаровую кислоту (о-гидроксикоричную кислоту) и умбелловую кислоту (п-гидроксикумаровую кислоту). В некоторых вариантах осуществления полимер является поперечно-сшитым с помощью полифункционального агента для поперечной сшивки (например, дифункционального агента для поперечной сшивки). В некоторых вариантах осуществления агент для поперечной сшивки содержится в количестве примерно от 0,01 примерно до 5%, или примерно от 0,1 примерно до 5,0%, или примерно от 0,2 примерно до 1% по отношению к общей массе присутствующих мономеров. В некоторых вариантах осуществления агенты для поперечной сшивки представляют собой дифункциональные мономеры для поперечной сшивки неполиалкениловых простых полиэфиров, таких как дивинилгликоль, 2,3-дигидроксигексан-1,5-диен, 2,5-диметил-1,5-гексадиен, дивинилбензол, N,N-диаллилакриламид, N,N-диаллилметакриламид; агенты для поперечной сшивки простых полиалкениловых полиэфиров, содержащие две или более группировки простого алкенилового эфира на молекулу, например группировки простых алкениловых эфиров, содержащие конечные группы  $H_2C=C$ , полученные от этерификации многоатомного спирта, содержащего по меньшей мере четыре атома углерода и по меньшей мере три гидроксильных группы, с помощью алкенилгалогенида, такого как аллилбромид или что-либо подобное, например полиаллилсахарозу, полиаллилпентаэритритол или что-либо подобное; диолефиновые негидрофильные макромерные агенты для поперечной сшивки, имеющие молекулярные массы примерно от 400 примерно до 8000, такие как нерастворимые диакрилаты и полиакрилаты и метакрилаты диолов и полиолов, продукты реакции с диизоцианатгидроксиалкилакрилатом или -метакрилатом преполномеров с изоцианатными окончаниями, полученные из диолов сложных полиэфиров, диолов простых полиэфиров или полисилоксандиолов с гидроксиалкилметакрилатами, и т.п.

В некоторых вариантах осуществления поперечно-сшитые полимеры получают из карбоксисодержащего моноэтиленненасыщенного мономера или мономеров в качестве единственного присутствующего моноэтиленненасыщенного мономера, вместе с агентом или агентами для поперечной сшивки. В некоторых вариантах осуществления полимеры являются такими, в которых примерно до 40%, а предпочтительно примерно от 0 примерно до 20 мас.% карбоксисодержащего моноэтиленненасыщенного мономера или мономеров замещается одним или несколькими не содержащими карбоксил моноэтиленненасыщенными мономерами, содержащими только физиологически и офтальмологически нетоксичные заместители, включая сложные эфиры акриловой и метакриловой кислоты, такие как метилметакрилат, этилакрилат, бутилакрилат, 2-этилгексилакрилат, октилметакрилат, 2-гидроксиэтилметакрилат, 3-гидроксипропилакрилат и т.п., винилацетат, N-винилпирролидон и т.п. (например, Mueller et al. патент США № 4548990). В некоторых вариантах осуществления полимеры содержат поликарбофил (Noveon AA-1), Carborol® и DuraSite®. В некоторых вариантах осуществления поперечно-сшитые полимеры получают посредством суспензионной или эмульсионной полимеризации мономеров с использованием обычных свободно-радикальных катализаторов полимеризации до размера сухих частиц не более примерно чем 50 мкм в терминах эквивалентного сферического диаметра. В некоторых вариантах осуществления средний размер сухих частиц составляет примерно от 1 примерно до 30 мкм или примерно от 3 примерно до 20 мкм в терминах эквивалентного сферического диаметра. В некоторых вариантах осуществления полимерные частицы получают посредством механического измельчения полимерных частиц

больших размеров. В других вариантах осуществления такие полимеры будут иметь молекулярную массу примерно от 250000 примерно до 4000000 и от 3000000000 до 4000000000. В других вариантах осуществления частицы поперечно-сшитого полимера являются моодисперсными, это означает, что они имеют распределение размеров частиц такое, что по меньшей мере примерно 80%, примерно 90% или примерно 95% частиц попадает в микронную зону распределения главных размеров частиц. В других вариантах осуществления моодисперсный размер частиц означает, что имеется не более чем примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% частиц размером меньше 1 мкм. В некоторых вариантах осуществления водная полимерная суспензия содержит примерно от 0,05 примерно до 1%, примерно от 0,1 примерно до 0,5% или примерно от 0,1 примерно до 0,5% агента и примерно от 0,1 примерно до 10%, примерно от 0,5 примерно до 6,5%, примерно от 0,5 примерно до 2,0%, примерно от 0,5% примерно до 1,2%, примерно от 0,6 примерно до 0,9% или примерно от 0,6 примерно до 0,8% полимерного суспендирующего агента. Хотя он упоминается в единственном числе, должно быть понятно, что можно использовать один или несколько видов полимерного суспендирующего агента, при этом его общее количество попадает в сформулированные диапазоны. В одном из вариантов осуществления количество нерастворимых слегка поперечно-сшитых полимерных частиц, pH и осмотическое давление могут коррелировать друг с другом и со степенью поперечной сшивки для получения композиции, имеющей вязкость в пределах примерно от 500 примерно до 100000 сП, а предпочтительно примерно от 1000 примерно до 30000 или примерно от 1000 примерно до 10000 сП, как измерено при комнатной температуре (примерно 25°C) с использованием Brookfield Digital LVT Viscometer, снабженного шпинделем номер 25 и малым держателем образца 13R при 12 об/мин. В некоторых вариантах осуществления вязкость составляет примерно от 10 примерно до 400 сП, примерно от 10 примерно до 200 сП или примерно от 10 примерно до 25 сП.

В некоторых вариантах осуществления водные полимерные суспензии могут приготавливаться таким образом, что они сохраняют одинаковую или, по существу, такую же вязкость в глазу, как они имели перед введением в глаз. В некоторых вариантах осуществления они могут приготавливаться таким образом, что имеется повышенное гелеобразование при контакте со слезной жидкостью. Например, когда препарат, содержащий DuraSite® или другой сходный полимер типа полиакриловой кислоты, вводится в глаз при pH меньшем примерно чем 6,7, полимер может набухать при контакте со слезной жидкостью, поскольку она имеет более высокий pH (примерно 7). Это гелеобразование или повышение гелеобразования может приводить к захвату суспендированных частиц, тем самым увеличивается время удерживания композиции в глазу. В некоторых вариантах осуществления агент медленно высвобождается, когда суспендированные частицы растворяются со временем. В некоторых вариантах осуществления этот способ доставки повышает комфорт пациента и увеличивает время контакта агента с тканями глаза, тем самым увеличивая степень поглощения лекарственного средства и продолжительность действия препарата в глазу. Агенты, содержащиеся в этих системах доставки лекарственных средств, будут высвобождаться из геля при скоростях, которые зависят от таких факторов как само лекарственное средство и его физическая форма, степень нагрузки лекарственного средства и pH системы, а также от любых вспомогательных веществ для доставки лекарственных средств, таких как ионообменные смолы, совместимые с поверхностью глаза, которые также могут присутствовать.

В некоторых вариантах осуществления антагонист IL-6 доставляется субъекту с использованием генетической доставки, например локальной генетической доставки. Такая доставка может осуществляться с помощью системы транзientной экспрессии, стабильной (например, встроенной) системы экспрессии, такой как лентивирусная система доставки, изготавливаемая Bluebird Bio (Cambridge, MA), или доставки в клеточной фабрике, такой как те, которые производятся Neurotech (Cumberland, Rhode Island).

Все технические особенности могут индивидуально объединяться во всех возможных сочетаниях таких особенностей.

Эквиваленты.

Настоящее изобретение может осуществляться в других конкретных формах без отклонения от его духа или главных характеристики. Следовательно, предшествующие варианты осуществления должны рассматриваться во всех аспектах как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящем документе.

#### Примеры

Следующие далее неограничивающие примеры дополнительно иллюстрируют варианты осуществления изобретений, описанных в настоящем документе.

Пример 1. Подтверждение действия локальной блокады IL-6 на модели неоваскуляризации хороидеи (CNV).

Для определения того, может ли локальная блокада IL-6 быть эффективной при лечении глазных заболеваний, например диабетического макулярного отека (DME) или влажной AMD, антитело анти-IL-6 вводится локально, используя модельную систему для неоваскуляризации хороидеи. Модель индуцированной лазером CNV ([eyecro.com/in-vivo/laser-induced-horoidal-neovascularization-cnv/](http://eyecro.com/in-vivo/laser-induced-horoidal-neovascularization-cnv/)) воспроизводит многие из патологических процессов, лежащих в основе DME, включая воспаление и ангиогенез. Исследования осуществляют на крысах от EyeCRO (Oklahoma City, OK). Шесть животных в каждой группе

подвергают воздействию билатеральной обработки лазером в день 0 с осуществлением трех повреждений в каждом глазу. В дни 3 и 10 3 мкг поликлонального антитела анти-IL-6 крысы (R&D Systems AF506; Minneapolis, MN) вводят исследуемой группе посредством инъекции в стекловидное тело (IVT), при этом PBS или поликлональное антитело анти-VEGF (R&D Systems AF564) вводят группам с несущей средой и группам с положительным контролем соответственно. Ангиографию *in vivo* осуществляют в дни 15 и 22 для измерения площади повреждений. Как в день 15, так и в день 22, группа, леченая антителом анти-IL-6, имеет значительно уменьшенную неоваскуляризацию по сравнению с контролем с несущей средой. Нет значительной разницы в реакции между группой, леченой антителом анти-IL-6, и положительным контролем с антителом анти-VEGF. Фиг. 1 показывает результаты такого эксперимента. Эти данные демонстрируют, что IL-6а, например антитело анти-IL-6, введенное IVT, может уменьшать неоваскуляризацию в модели CNV крыс до уровней, сходных с положительным контролем с антителом анти-VEGF ( $p=0,0054$  в день 15 и  $p=0,0005$  в день 22 для антитела анти-IL-6 по сравнению с контролем с несущей средой).

Эти данные показывают, что локальная блокада IL-6 может быть пригодной для использования при лечении глазных заболеваний, таких как заболевания, включающие пропотевание жидкости через сосуды, например макулярный отек.

Пример 2. Кандидаты в антитела антагонисты против IL-6.

Кандидаты в антитела антагонисты против IL-6 разрабатывают с использованием способа, который включает сначала иммунизацию. Иммунизацию осуществляют под руководством авторов настоящего изобретения в конкретной исследовательской организации (CRO). Пять мышей BALB/C получают в виде подкожной инъекции 80 мкг IL-6 человека (R&D Systems, cat# 206-IL/CF, Minneapolis, MN) в PBS, содержащем 1M NaCl с адьювантом Фройнда. Осуществляют две активизации с помощью 80 мкг и 50 мкг IL-6. Собирают клетки селезенки у мышей с самым высоким титром и осуществляют их слияние с клетками миеломы P3×763Ag8.653 с образованием гибридом.

Супернатанты гибридом просматривают относительно связывания и антагонизма к IL-6. Для осуществления ELISA со связыванием планшеты Costar 9018 покрывают 1 мкг/мл IL-6 человека в PBS в течение ночи при 4°C. Лунки блокируют PBS, содержащим 2% BSA, промывают, а затем инкубируют с помощью 50 мкл каждого супернатанта гибридомы, разбавленного 1:2 PBS, содержащего 2% BSA. Через 60 мин лунки промывают три раза 300 мкл PBS, содержащего 0,1% Tween-20. Антитела анти-HRP мыши, разбавленные 1:3000 в PBS-BSA, затем добавляют их в каждую лунку и инкубируют в течение 30 мин. Лунки промывают, как выше, затем добавляют субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) и измеряют сигнал на 450 и 550 нм. Для исследования антагонизма репортерные клетки HEK-Blue™-IL-6 (InvivoGen, San Diego, CA) инкубируют при повышении концентрации IL-6 человека в присутствии разбавленного 1:10 супернатанта гибридомы. Через 20-24 ч 20 мкл супернатанта смешивают с 180 мкл QuantiBlue™ (InvivoGen) и измеряют коэффициент поглощения на 655 нм.

На основе исследования связывания и антагонизма гибридома 64 выбрана авторами настоящей заявки как перспективный кандидат и субклонирована на CRO. Гибридома 64 (моноклональная гибридома мышиных) исследуется в дальнейшем на способность ингибирования связывания комплекса IL-6/IL-6R $\alpha$  с gp130 с использованием иммуносорбентного анализа со связанными ферментами (ELISA). Гибридома 64 при концентрации 1,5 мкг/мл значительно уменьшает связывание комплекса IL-6/IL-6R $\alpha$  с иммобилизованным gp130 согласно ELISA (фиг. 2).

Субклоны просматривают и варибельные домены субклона 64.58 амплифицируют с помощью 5' RACE PCR и секвенируют. Последовательности варибельного домена мыши (упоминается как m64) являются следующими:

m64 VH (варибельный домен тяжелой цепи)

QVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASGYAFSNYLIIEWVKQRPGQGLEWIGVITPGSGTIN

YNEKFKGKAVLTADKSSSTVYMQLSLSTSDSAVYFCAKSRWDPLYYYALEYWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO:13)

m64 VL (варибельный домен легкой цепи)

DIVLTVQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPKLLIYAASNQG

SGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPLTFGAGTKLELK (SEQ ID

NO:14)

Для создания гуманизованных последовательностей области, определяющие комплементарность (CDR), m64 прививают на каркас зародышевой линии человека, выбранный в связи с его сходством с последовательностью мыши посредством компьютерного алгоритма. Гуманизованные последовательности (упоминаются как m64) являются следующими (измененные остатки по сравнению с последовательностями m64 подчеркнуты) и имеют идентичность примерно 79,5% (VH) и идентичность 84,4% (VL) с последовательностями мышиных:

h64 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSNYLIEWVRQAPGGLEWGMGVITPGSGTIN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDP LYYYYALEYWGQGT TTVTVSS  
 (SEQ ID NO:15)

h64 VL

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVDNYGISFMNWIYQQKPGQPPKLLIYAASNQG  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLOAEDVAVYYCQOSKEVPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
 NO:16)

Гуманизированные последовательности синтезируют с помощью DNA2.0 (Menlo Park, CA), затем клонируют в векторы экспрессирования, полученные из pcDNA3.1 в качестве inline слияний с константными доменами IgG1 человека. IgG экспрессируют посредством транзientного трансфицирования в клетках Freestyle™-293 (Invitrogen, Grand Island, NY) и очищают с помощью хроматографии на белке А. В исследованиях как связывания, так и антагонизма, IgG h64 демонстрирует значительно сниженную эффективность по сравнению с его предшественником m64. По этой причине дрожжевой дисплей используют для восстановления утерянного сродства.

Для осуществления созревания сродства, разработанного для восстановления или улучшения сродства гуманизованного h64IgG, последовательности антитела h64 повторно клонируют для генерирования молекулы Fab в дрожжевых векторах, полученных из pYC2/CT, в которых цепь FabH сливается с scFv 4m5.3 антитела анти-FITC через линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 29). Затем генерируется библиотека вариантов h64 посредством допускающей ошибки PCR, следуя протоколу Chao et al. (2006, Nature Protocols, 1:755-768). Варианты H64 экспрессируются и захватываются на поверхности дрожжей, меченных FITC-PEG-NHS, затем инкубируются вместе с биотинилированным IL-6 человека. Связанный IL-6 детектируется с помощью стрептавидина-APC, и клетки с самым большим количеством связанного IL-6 по сравнению с количеством Fab дисплея выбираются с помощью селекции на клеточном сортере BD FACSAria™. После четырех заходов селекции выбирается с помощью селекции и секвенируется популяция вариантов с более высоким сродством. Последовательность клона, выбранного с помощью селекции посредством созревания сродства (упоминается как h64-1.4), является такой, как следует далее с выбранными с помощью селекции мутациями (т.е. мутировавшего по сравнению с последовательностями h64 VH и VL), выделенными жирным шрифтом, и CDR подчеркнуты. Они представляют собой переменные домены 018 (а также молекулы 020 и 029 IL-6а, описанные ниже). Отметим, что полные Fab содержат домены СК и СН1 IgG1. В контексте настоящей заявки упоминание последовательности аминокислот тяжелой цепи или легкой цепи "Fab" означает, что последовательность может представлять собой часть функционирующей Fab, состоящего из последовательности, полученной из легкой цепи, и последовательности, полученной из тяжелой цепи.

h64-1.4 VH (018VH) (вариабельный домен)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALSNYLIEWVRQAPGGLEWGMGVITPGSGTIN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDP LYYYYALEYWGQGT TTVTVSS  
 (SEQ ID NO:17)

h64-1.4 VL (018VL) (вариабельный домен)

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVDNYGI PFMNWIYQQKPGQPPKLLIYAASNRG  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLOAEDVAVYYCQOSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (SEQ II  
 NO:18)

Переменные домены h64-1.4 повторно клонируются в вектор pcDNA3.1 IgG1 человека и экспрессируются как IgG1 полной длины в клетках Freestyle™-HEK293 (Life Technologies). Полученные в результате очищенные IgG являются значительно более эффективными, чем исходное антитело h64 при исследованиях, как связывания, так и клеточного антагонизма. При исследовании сродства с использованием системы дрожжей сродство увеличивается от 343 пМ для исходной гуманизованной молекулы до 43 пМ. Эффективность антагониста была увеличена примерно в десять раз, как проанализировано с использованием системы клеток HEK-Blue.

IgG h64-1.4 переформатируется как Fab для использования при глазных и других показаниях. В дополнение к этому осуществляют другой заход генерирования библиотеки и селекции на основе дрожжей для дальнейшего улучшения сродства. После четырех заходов селекции имеется значительное обогащение варианта VH с мутацией A7 9V. Антитела, варианты и их фрагменты, содержащие вариант A79V, упоминаются как антитела 019 IL-6а, их варианты и фрагменты.

Пример 3. Селекция формата.

Для исследования соответствующих форматов для антагониста IL-6 на основе антитела антитела

против IL-6, выбранные с помощью селекции, как описано выше, исследуются относительно транзientной экспрессии, стабильности, свойств агрегации, сродства связывания и IC<sub>50</sub> с использованием форм Fab, scFv(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) и scFv(V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) последовательностей 018.

Результаты этих исследований для одной из молекул кандидатов для IL-6а (последовательности, содержащие варибельную область 018) показаны в табл. 1.

Таблица 1

Параметр	Fab	scFv (V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> )	scFv (V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> )
Транзientная экспрессия	45 мг/мл	2 мг/л	4 мг/л
Стабильность (T <sub>m</sub> )	73°C	43°C	46°C
Агрегация (SEC, MALS)	Нет	Да	Не применимо
Сродство связывания (K <sub>D</sub> )	240 пМ	1 нМ	720 пМ
IC <sub>50</sub> для 10 пМ IL-6	255 пМ	160 пМ	125 пМ

Эти данные демонстрируют способ идентификации ключевых особенностей различных форматов антагониста IL-6 на основе антитела и иллюстрируют, что для антагонистов IL-6, содержащих варибельные области 018, формат 018Fab имеет наиболее благоприятные особенности в большинстве ключевых категорий, т.е. экспрессию, стабильность, агрегацию и сродство связывания, по сравнению с конфигурацией scFv. IC<sub>50</sub> Fab 018 попадает в разумный диапазон для терапевтического применения.

Пример 4. Примеры антител IL-6а, их фрагментов и производных.

Авторы настоящей заявки идентифицировали следующие последовательности, используя способы, описанные в настоящем документе. Подчеркнутые последовательности представляют CDR тяжелых и легких цепей. Другие последовательности можно найти в описании.

Последовательность полипептидов тяжелой цепи 018 (полной длины; f018HC) в каркасе IgG1

QVQLVQSGAEVVKKPGSSVKVSCSKASGYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTIN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSSA  
 STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK (SEQ ID NO:19)

Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи 018 (полной длины; f018HC) в каркасе IgG1

CAAGTGCAGTCGGTGCAGTCAGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGT  
 ATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGCCCTTTCAAACCTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCC  
 GGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTATCACCCCTGGGAGCGGCACCATTAATTACGCCCAGA  
 AATTTACAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTC  
 CTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGAGTCGATGGGACCCCTCTTTAC  
 TATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTATCTGCTAGCACAAAAG  
 GACCATCAGTCTTCCCACTTGCTCCTTCACTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGG  
 CTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGAACTCCGGTGCAGTACACA  
 TCCGGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTCGGTGG  
 TCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTC  
 CAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACCATACGTGTCTCTCC  
 TGTCCC GCCCTGAACTGCTGGGAGGCCCTTCTGTGTTCTGTCTCCACCTAAGCCAAAGGACA  
 CTCTGATGATCAGCCGGACTCCCGAGGTTACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAAGACCC  
 TGAGGTTAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAACGCAAAAACCAAGCCGAGA  
 GAGGAGCAGTACaaTAGCACCTATAGAGTAGTGAGCGTCTGACTGTCTTACATCAGGATTGGC

TCAATGGTAAAGAATATAAGTGCAAGGTAAGCAACAAGGCCCTACCCGCACCAATAGAGAAGAC  
 CATCTCCAAGGCGAAAGGTCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTTTATACACTGCCTCCCTCACGCGAC  
 GAATTAACAAAGAATCAGGTGTCTCTCACCTGTCTCGTCAAGGGCTTTTACCCTTCCGACATCG  
 CCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTATAAGACAACCTCCCCAGTCCTGGA  
 TTCAGATGGGTCGTTCTTTCTATATAGTAAGTTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAACAGGGG  
 AACGTGTTCTCTTGCTCTGTTATGCATGAAGCGCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGT  
 CCCTGAGCCCCGGGAAG (SEQ ID NO:20)

Последовательность полипептидов тяжелой цепи Fab 018 (018FabHC) в каркасе IgG1.CDR подчеркнуты

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTIN  
YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGTTVTVSSA  
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC (SEQ ID NO:1)

Последовательность полипептидов легкой цепи 018 полной длины (f018LC). CDR подчеркнуты

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPK  
LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCOOSEEVPL  
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV  
 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

Это представляет собой также и последовательность легкой цепи для 020 и 029 антагонистов IL-6.

Последовательность нуклеиновых кислот легкой цепи 018 полной длины (018LC) в каркасе IgG1

GACATAGTGA TGACTCAAAG TCCGGACAGC CTGGCGGTGT CACTCGGCGA  
ACGGGCAACT ATCAACTGCC GAGCCAGCGA GAGCGTCGAT AATTACGGCA  
TCCCCTTCAT GAACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGACAGCC GCCCAAGCTG  
CTTATCTACG CCGCTTCCAA CCGGGGATCA GGGGTGCCCG ATCGATTTAG  
TGGAAGCGGT AGTGGGACCG ATTCACACT GACCATCAGC TCCCTTCAGG  
CCGAGGATGT GGCTGTCTAT TATTGTCAGC AATCCGAGGA AGTGCCGCTC  
ACGTTTGGTC AGGGAACCAA ACTGGAGATC AAGCGGACCG TAGCGGCGCC  
TAGTGTCTTC ATCTTCCCAC CCTCCGACGA ACAGCTGAAG TCTGGCACTG  
CTTCCGTCGT GTGCCTGCTC AACAACTTTT ACCCTAGAGA GGCAAAAGTT  
CAATGGAAAG TAGACAATGC CTTGCAGTCC GGGAACTCCC AGGAGTCTGT  
CACAGAGCAG GATAGTAAGG ACTCAACCTA CAGCCTGTCC AGCACACTGA  
CCCTCTCCAA AGCCGACTAC GAGAAGCACA AAGTGTACGC TTGCGAAGTT  
 ACGCATCAGG GGCTGTCTC ACCCGTTACA AAAAGTTTTA ACAGAGGGGA GTGC (SEQ  
 ID NO:26)

Тяжелая цепь Fab 019 (FabHC019, такая же, как последовательность как для FabHC018, за исключением A79V (жирный шрифт/курсив))

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL  
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT  
 QTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSC (SEQ ID NO:3)

VH 019 (вариабельная область/HC019)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWQGTTVTV SS (SEQ ID NO:27)

Последовательность легкой цепи антитела 019 (LC019) (для полипептида и нуклеиновых кислот) такая же, как для LC 018

CDR1 018HC ( CDR1 VH 018) : GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)  
 CDR2 018HC ( CDR2 VH 018) : VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)  
 CDR3 018HC ( CDR3 VH 018) : SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)  
 CDR1 018LC ( CDR1 VL) : RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:7)  
 CDR2 018LC ( CDR2 VL) : AASNRRGS (SEQ ID NO:8)  
 CDR3 018LC ( CDR3 VL) : QQSEEVPLT (SEQ ID NO:9)  
 CDR1 019HC ( CDR1 VH 019) : GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)  
 CDR2 019HC ( CDR2 VH 019) : VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)  
 CDR3 019HC ( CDR3 VH 019) : SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)

#### Пример 5. Картирование эпитопа и структуры.

##### Картирование эпитопа.

Функциональное картирование эпитопа осуществляют на выбранных с помощью селекции кандидатах в антагонисты IL-6. Обнаружено, что антитело кандидат (антитело 64 мышинных) не уменьшает связывания IL-6R $\alpha$  с IL-6 при анализе ELISA, это показывает, что антитело кандидат не связывается с сайтом I. Осуществляют дополнительные эксперименты, демонстрирующие, что химерное антитело 64 мышинных уменьшает связывание комплекса IL-6/IL-6R $\alpha$  с gp130 при анализе ELISA, показывая, что либо сайт II, либо сайт III IL-6 захватывает сайт связывания антитела. Также обнаружено, что антитело 64 мышинных не блокирует значительно связывания известного сайта III связывания антитела AN-65 (Immunotech, Marseille, France) с IL-6, показывая, что антитело кандидат связывает сайт II IL-6. Эти данные демонстрируют, что антитела против сайта II могут генерироваться, и демонстрируют способ идентификации таких антител.

Для дополнительного определения эпитопа генерируются мутации IL-6 в дрожжах как слияния с 4m5.3 (Boder et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10701-10705; Chao et al., 2006, Nat. Protoc 1, 755-768). Экспрессируемые мутации находятся в IL-6 человека, это следующие одинарные или двойные мутации: R24E/D27E, R30E, Y31E, D34R, S118R/V121E, W157E, Q159E/T162P, K171E и R179E. Экспрессируемые мутантные молекулы IL-6 используются при исследованиях связывания с 018 (Fab). Наблюдают уменьшение сродства к (Fab) 018 для R24E/K27E, Y31E, D34R и S118R/V121R, все они находятся в сайте II IL-6. Соответственно, изобретение, описанное в настоящем документе, включает антитело, которое связывается по меньшей мере с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотами в положении 24, 27, 31, 34, 118 и 121 IL-6 человека или эквивалентного сайта в IL-6.

##### Структурное определение эпитопа сайта II.

Вычисляются следующие расстояния для структурного определения сайта II. Вычисления основываются на гексамерной кристаллической структуре IL-6/IL-6a/gp130, PDB 1P9M (Boulangier et al., 2003, Science 300: 2101-2104). Спираль 1 IL-6 проходит между сайтом I и сайтом II, давая в результате определенные остатки, которые попадают близко к сайту II, но имеют боковые цепи, которые направлены в сторону сайта I, например R30. D2 и D3 относятся к внеклеточным доменам IL-6R $\alpha$ .

Следующие аминокислоты IL-6, как определено, попадают в пределы 5<sup>TM</sup> от D2-D3 gp130: L19, R24, K27, Q28, R30, Y31, D34, E110, Q111, R113, A114, M117, S118, V121, Q124, F125 и K128.

Следующие аминокислоты, как определено, попадают в пределы 7Å от D2-D3 gp130: L19, E23, R24, I25, K27, Q28, I29, R30, Y31, D34, K41, Q102, E109, E110, Q111, A112, R113, A114, V115, Q116, M117, S118, K120, V121, L122, Q124, F125 и K128.

Соответственно, молекула, например антитело или его фрагмент, который может связывать одну или несколько аминокислот IL-6, попадающих в пределы 5Å или 7Å от сайта II, может представлять собой IL-6a.

Последовательность IL-6 человека приводится ниже для сравнения (подчеркнутая последовательность представляет собой лидерную последовательность). Аминокислоты в пределах 7Å от D2-D3 gp130 обозначены курсивом. Нумерация аминокислот, т.е. мутаций, используемых для определения эпитопов, не содержит лидерной последовательности.

##### IL-6 человека

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRY

ILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFE

VYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQ

DMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO:21)

Осуществляются эксперименты по исследованию фрагмента Fab гуманизированного антитела h64-1.4, и они демонстрируют, что возможно блокирование передачи сигналов как цис-, так и транс-IL-6, которое вызывается нацеливанием на сайт II. Эффективность фрагмента Fab не изменяется в присутствии растворимого рецептора IL-6 (sIL-6R). Это является противоположностью антителу анти-IL-6R IgG,

у которого эффективность уменьшается в присутствии sIL6R, и которое блокирует только цис-передачу сигналов.

Эти эксперименты демонстрируют, что антитело или фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab, который нацелен на сайт II, можно использовать для ингибирования передачи сигналов как цис-, так и транс-IL-6.

Пример 6. Исследования на приматах.

Поскольку активности для существ иных, чем приматы, могут сильно отличаться от активности на приматах, кандидаты в антагонисты IL-6, как правило, дополнительно оцениваются относительно РК и других параметров с использованием приматов, отличных от человека. IL-6 человека отличается от IL-6 яванского макака и макака-резус в семи сайтах, один из которых находится в сайте II (аминокислота 28) и является таким же, как сайт II африканской зеленой мартышки IL-6. Это, видимо, уменьшает связывание антитела, содержащего последовательности 018, всего лишь примерно в 3-4 раза. Способность к связыванию IL-6 приматов, отличных от человека, представляет собой полезную особенность антагониста IL-6, облегчая разработку кандидата в лекарственное средство, например, давая возможность исследования, такого как токсикологическое исследование на приматах, отличных от человека.

Как и большинство антител против IL-6, антитела анти-IL-6, описанные в настоящем документе, не взаимодействуют перекрестно с IL-6 грызунов, кроликов или собачьих из-за низкой гомологии последовательностей. Однако при исследованиях сродства обнаружено, что Fab 018 связывает IL-6 яванского макака и африканской зеленой мартышки приблизительно с таким же сродством, как и для человека (табл. 2).

Таблица 2

Одновалентное сродство (Fab 018) по отношению к различным IL-6 различных видов

Виды	$K_D$
Человек	200 пМ
Африканская зеленая мартышка	280 пМ
Яванский макак	840 пМ
Собака	>1 мкМ
Мышь	>1 мкМ
Кролик	>1 мкМ
Крыса	>1 мкМ

Эти данные дополнительно демонстрируют способность IL-6а, как описано в настоящем документе, к специфичному связыванию и возможность разработки молекулы, имеющей особенности, делающие возможным исследование, например изучение токсикологии и репродуктивные исследования, на соответствующем животном.

Пример 7. Повышение экспрессии IL-6а.

Для повышения экспрессии полипептидов Fab 018 и Fab 019 получают конструкторы, вводя пять дополнительных аминокислот (DKTHT (SEQ ID NO: 30) ) в тяжелую цепь в области СН1/шарнира с использованием способов, известных в данной области. Последовательность измененной тяжелой цепи Fab 018 показана ниже как SEQ ID NO: 24. Измененная последовательность 018 упоминается в настоящем документе как 020, и измененная последовательность 019 упоминается в настоящем документе как 021. Молекула 020 (тяжелая цепь Fab 020 и легкая цепь Fab 018) имеет улучшенное экспрессирование по сравнению с исходным Fab, который имеет тяжелую цепь Fab 018 и легкую цепь Fab 018. Молекула 019 не демонстрирует значительных различий по сродству по сравнению с молекулой 020. Экспрессирование как 020, так и 019 повышается примерно в два раза, соответственно, и сродство не подвергается влиянию этого изменения.

Тяжелая цепь 020 (Fab с DKTHT (SEQ ID NO: 30) на карбоксиокончании)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWVMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT  
 QTYICNVNHK PSNTKVDKVV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 24)

Антагонизм IL-6 с использованием Fab 020 измеряют на репортерных клетках HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen, San Diego, CA). Клетки инкубируют в смеси 10 пМ IL-6 и при изменяющихся концентрациях антитела, либо 020, либо IL-6Rα (Cell Sciences, Canton, MA), либо с 50 нМ IL-6Rα, либо без него. Через 20-24 ч инкубирования 20 мкл супернатанта клеточной культуры смешивают с 180 мкл субстрата Quan-

tiBlue™ (InvivoGen) и инкубируют в течение 1 ч; затем измеряют коэффициент поглощения на 655 нм. Фиг. 3А и 3В показывают данные от этих экспериментов, демонстрируя способность 020 ингибировать активность IL-6 в присутствии или в отсутствие IL-6R.

Пример 8. Антитела IgG2 против IL-6.

018 переформатируют в каркасе изотипа IgG2 человека для уменьшения связывания FcγR и уменьшения ADCC по сравнению с форматированным антителом IgG1 с использованием способов, известных в данной области. В дополнение к этому переформатирование 018 в формат полной длины, например IgG2, как ожидается, уменьшит скорость выведения из стекловидного тела благодаря большему размеру молекулы.

Конструирование/очистка антитела IgG2 анти-IL-6.

Для конструирования антител IgG2 человека с использованием последовательностей антитела анти-IL-6, описанных выше, константный домен IgG2 человека амплифицируется с помощью PCR с cDNA с сайтами рестрикции NheI и MluI на N- и C-конечных краях соответственно. Продукт PCR очищается, переваривается с помощью ферментов рестрикции NheI и MluI, а затем лигируется в вектор pTT5, содержащий варибельный домен анти-IL-6, т.е. SEQ ID NO: 1 (см. выше). Это дает последовательность тяжелой цепи IgG2 полной длины. Плазмиды, содержащие легкую цепь полной длины, содержащую последовательность 018, используют для получения легкой цепи.

Для дополнительного уменьшения связывания FcRn и, тем самым, уменьшения рециклирования IL-6а осуществляют точечные мутации в тяжелой цепи. Мутации осуществляют с помощью мутагена QuikChange® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Плазмиды тяжелой и легкой цепи совместно трансфицируются с использованием поли(этиленimina) (PEI) в 100-мл транзистентные культуры клеток HEK293-6E и культивируются, чтобы сделать возможным экспрессирование в течение примерно пяти дней. Это генерирует антитела, содержащие остаток связывания сайта II антитела анти-IL-6 и структуру IgG2. Такие структуры, содержащие CDR 018, определяются в настоящем документе как 018 IgG2 или 029. Точечные мутации осуществляют на остатках 1253.

Молекула IgG2 хорошо экспрессирует и блокирует IL-6 при клеточных анализах с чуть улучшенной эффективностью по сравнению с Fab 020.

Зрелые последовательности 029 (CDR подчеркнуты).

Тяжелая цепь 029

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYALS	<u>NYLIEWVRQA</u>	PGQGLEWMGV
<u>ITPGSGTINY</u>	AQKFQGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARSR
<u>WDPLYYYALE</u>	<u>YWGQGT</u> TVTV	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL
VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSSV	VTVPSSNFGT
QTYTCNVNHNK	PSNTKVDKTV	ERKCCVECPP	CPAPPVAGPS	VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST
FRVSVLTVV	HQDWLNGKEY	KCKVSNKGLP	APIEKTISKKT	KGQPREPQVY
TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPMLD
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK (SEQ ID NO:11)

Легкая цепь 029

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCREASESVD	<u>NYGIPFMN</u> WY	QOKPGQPPKL
<u>LIYAASNRGS</u>	<u>GVPDRFSGSG</u>	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	<u>YCOQSEEVPL</u>
<u>TFGQGTKLEI</u>	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV
QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSL	STLTLSKADY	EKNKVYACEV
THQGLSSPVT	KSFNRGEC	(SEQ ID NO:12)		

Измененное связывание FcRn.

IL-6 может иметь определенные положительные системные воздействия. Следовательно, является преимущественным получение с помощью генной инженерии IL-6а, который имеет хорошее удерживание в стекловидном теле, но имеет ограниченное системное время полужизни. Уменьшение или устранение связывания FcRn должно уменьшить системную аккумуляцию любого лекарственного средства, которое утекает в циркуляцию, улучшая тем самым безопасность IL-6а.

Соответственно, поскольку медируемая FcRn направленная миграция может увеличить отток антител из глаза, 020 IgG2 дополнительно модифицируют для устранения связывания FcRn посредством введения мутаций Fc на остатках I254, H311 или H436 (см. SEQ ID NO: 23) (нумерация в соответствии с Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)). Сайты мутации показаны жирным шрифтом в SEQ ID NO: 23; I254 мутирует до A или R, H311 мутирует до A или E, H436 мутирует до N, когда D313 мутирует

до Т, и Н436 мутирует до А (нумерация начинается после лидерной последовательности, которая подчеркнута в SEQ ID NO: 23, антагонисты IL-6, содержащие такие последовательности, определяются как 018IgG2m.

Тяжелая цепь антитела анти-IL-6 (IgG2) (обычный шрифт: VH; курсив: CH) (без лидерной последовательности), показаны сайты мутации (жирный шрифт)

```

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT
QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKY KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID
NO:23)

```

Тяжелая цепь антитела анти-IL-6 (IgG2) (обычный шрифт: VH; курсив: CH) с лидерной последовательностью (подчеркнута), показаны сайты мутации (жирный шрифт)

```

MDWTRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS
NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV
FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
APIEKTISKY KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

```

Соответственно, некоторые варианты осуществления включают антитело, имеющее последовательность тяжелой цепи, изображенную как SEQ ID NO: 23, с мутациями на I254 (например, А или R), H311 (мутирует до А или Е), H436 (мутирует до А) или D313 (мутирует до Т), когда H311 мутирует до N.

Следовательно, SEQ ID NO: 25 предлагает последовательность, которая, когда она мутирует на I133 (например, I133А или I133R), H190 (например, H190А мутирует на H190Е), H315 (например, H315А) или D192 с H190 (например, D192Т с H190N), может использоваться в качестве антитела, его фрагмента или производного для получения полипептида, имеющего уменьшенное связывание с Fc при низких рН, например, при рН 5,5, или при лизосомальном рН, и/или полипептида, имеющего уменьшенное системное время полужизни по сравнению с исходной или другой эталонной молекулой, которая не содержит этой последовательности.

```

SASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS
GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV
ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPPEV TCVVVDVSHE
DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY
KCKVSNKGLP APIEKTISKY KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:25)

```

Легкая цепь антитела анти-IL-6 (IgG2) (обычный шрифт: VK; курсив: CK)

```

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWFYQQKPGQPPKLLIYAASNRG
SGVPDRFSGSGSGTDFLTLSISLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDYSTYSLT STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID
NO:22)

```

Пример 9. Стабильность препарата.

Стабильность фрагмента Fab анти-IL-6/IgG1 (содержащего домен CH1 IgG1) исследуют посредством определения T<sub>m</sub> сначала в PBS, а затем в наборе буферов и наполнителей с использованием диффе-

рениальной сканирующей флуорометрии. Обнаружено, что цитратный буфер, pH 5,5, повышает  $T_m$  до более чем 80°C. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления IL-6а предлагается в цитратном буфере, и в некоторых случаях он имеет  $T_m$  по меньшей мере 80°C.

Агрегацию исследуют с использованием SEC-MALS, и никакой агрегации не наблюдается при 20 мг/мл в фосфатном буферном солевом растворе (PBS).

Пример 10. pH-чувствительные антитела для улучшения РК.

IL-6 могут иметь определенные положительные системные воздействия. По этой причине является преимуществом получение с помощью генной инженерии IL-6а, который имеет хорошее удерживание в стекловидном теле, но имеет ограниченное системное время полужизни. Уменьшение или устранение связывания с FcRn должно уменьшить системную аккумуляцию любого лекарственного средства, которое утекает в циркуляцию, тем самым улучшая безопасность IL-6а. Соответственно, поскольку медируемая FcRn направленная миграция может увеличить отток антител из глаза, 020 IgG2 дополнительно модифицируют для устранения связывания FcRn посредством введения мутаций Fc на остатках I253, H310 или H435 (нумерация в соответствии с Martin et al. (*Molecular Cell*, 7:4,867-877 (2001))). Такие антитела упоминаются в настоящем документе как антитела IL-6pH или антитела анти-IL-6pH и дополнительно описываются ниже.

Генерирование антител с pH-чувствительным связыванием рКа гистидина составляет примерно 6,0 и гистидины, вставленные на границах раздела связывания, могут разрушать связывание при протонировании боковых цепей при низких значениях pH. Используя антитело, нацеленное на сайт II, антитело анти-IL-6, как описано в настоящем документе, генерируют библиотеку, содержащую обогащенные гистидином варианты CDR от 018, и эту библиотеку просматривают относительно pH-чувствительного связывания с использованием дрожжевого дисплея. Генерируемая библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку с CDR кодируемыми вырожденными кодонами, так что каждый остаток представляет собой либо остаток дикого типа (т.е. такой же, как в исходном антителе), либо гистидиновый остаток. Скрининг осуществляют посредством поочередной сортировки относительно высокого связывания при физиологических pH (7,4) и низкого связывания при эндосомальном pH (5,5).

С помощью дрожжевой селекции идентифицируется мутант, который имеет относительно высокое связывание при pH 7,4 (одновалентную Kd 4 07 pM для мутанта по сравнению с 192 pM для исходной молекулы) и относительно низкое связывание при pH 5,5 (одновалентную Kd 2,362 nM для мутанта по сравнению с 195 pM для исходной молекулы). Это составляет изменение приблизительно в 5,8 раза для сродства при pH 5,5. Этот мутант содержит множество гистидиновых мутаций в CDR1 легкой цепи. Таким образом, этот мутант демонстрирует связывание, сходное с исходной молекулой при pH 7,4, и значительную потерю сродства при pH 5,5. Это наблюдение проверяют с использованием анализа ELISA, FACS и анализа SPR, с помощью способов, известных в данной области.

Эти данные демонстрируют, что может быть создан IL-6а, который основан на антителе, который имеет особенности нацеливания антитела анти-IL-6 на сайт II IL-6, что можно использовать для ингибирования активности как цис-, так и транс-IL-6, и он имеет улучшенную РК по сравнению с исходным антителом или другим антителом, имеющим домен Fc дикого типа, на него влияет, по меньшей мере, частичное изменение связывания при pH 5,5.

Пример 11. Эффективность локальной блокады IL-6 в модели лазерной неоваскуляризации хороидеи (CNV) мышей.

Для определения того, может ли локальная блокада IL-6 быть эффективной при лечении глазного заболевания, например диабетического макулярного отека (DME) или влажного AMD, моноклональное антитело анти-IL-6 вводится локально в модельную систему для неоваскуляризации хороидеи. Лазерно индуцированную модель CNV, как описано в Saishin et al. *Journal of Cellular Physiology*, 195:241-248 (2003), используют в настоящем примере. Модель лазерно индуцированной CNV воспроизводит множество патологических процессов, лежащих в основе диабетического макулярного отека (DME), включая воспаление и ангиогенез.

Моноклональное антитело анти-IL-6 мыши (MP5-20F3, которое представляет собой антитело изотипа IgG1 крысы, купленное от Bio X Cell, catalog number BE0046), вводят исследуемой группе посредством инъекции в стекловидное тело (IVT). Контроли принимают инъекцию в стекловидное тело ловушки VEGF или инъекцию в стекловидное тело контрольного антитела изотипа анти-HRP (IgG1 крысы против пероксидазы хрена, клон HRPN, покупают у BioXCell; catalog number BE0088). Для всех групп антител, 20 мкг белка в объеме 1 мкл вводят посредством инъекции в исследуемый глаз, при этом противоположный глаз оставляют нелеченым в качестве дополнительного контроля.

Мышей умерщвляют посредством эвтаназии в день 7 после лазерного воздействия и плоские срезы хороидеи окрашивают лектином Griffonia simplicifolia (GSA) для измерения площади повреждений.

Фиг. 4 показывает результаты. Группа, леченная антителом анти-IL-6, показывает статистически значимое уменьшение неоваскуляризации по сравнению с группой, леченной контрольным антителом ( $p < 0,05$ ). В среднем, группа, леченная антителом анти-IL-6, также показывает уменьшение неоваскуляризации по сравнению с положительным контролем с антителом анти-VEGF.

Эти данные демонстрируют, что IL-6а, например моноклональное антитело анти-IL-6, вводимое IVT, может значительно уменьшить неоваскуляризацию в модели CNV мышей. Кроме того, результаты говорят, что антитело анти-IL-6 может осуществлять уменьшение неоваскуляризации, по меньшей мере, такое же, а возможно и большее, чем антитело анти-VEGF. Эти данные показывают, что локальное ингибирование IL-6 является полезным при лечении глазных заболеваний, таких как заболевания, включающие пропотевание жидкости через сосуды, например влажное AMD или макулярный отек, например диабетический макулярный отек.

Пример 12. Разработка улучшенного антитела против IL-6.

Генерируются варианты антитела EBI-029. Чтобы лучше характеризовать вклад мутаций A28V, S30P, I51T и S55G, конкретные сочетания вводятся в вектор дисплея Fab EBI-029 дикого типа и измеряется связывание. Результаты показаны на фиг. 5. После конкуренции в течение ночи с 2 мкМ IL-6 все мутанты имеют значительно более высокие уровни биотинилированного IL-6, остающегося на их клеточных поверхностях, по отношению к дисплею по сравнению с Fab EBI-029 дикого типа. Расположение по порядку для связывания от самого высокого до самого низкого средства представляет собой A28V/S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > I51T/S55G > WT. Учетверенная мутация A28V/S30P/I51T/S55G упоминается также в настоящем документе как EBI-030.

Последовательности EBI-030 показаны ниже.

Последовательности CDR 030:

CDR1 030HC ( CDR1 VH 030): GYVLPNYLIE (SEQ ID NO:31)

CDR2 030HC ( CDR2 VH 030): VTPGGGTIN (SEQ ID NO:32)

CDR3 030HC ( CDR3 VH 030): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:33)

CDR1 030LC ( CDR1 VL 030): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:34)

CDR2 030LC ( CDR2 VL 030): AASNRGS (SEQ ID NO:35)

CDR3 030LC ( CDR3 VL 030): QQSEEVPLT (SEQ ID NO:36)

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи 030 (мутации по сравнению с 029 показаны жирным шрифтом):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SS (SEQ ID NO:37)

Последовательность вариабельной области легкой цепи 030:

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNRG  
SGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSLAEDVAVYYQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (SEQ ID  
 NO:38)

Последовательность полипептидов тяжелой цепи Fab (IgG1) 030 (CDR подчеркнуты, мутации по сравнению с 029 показаны жирным шрифтом):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGLC  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT  
 QTYICNVNHK PSNTKVDKQV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)

В некоторых вариантах осуществления последовательность DKTHT (SEQ ID NO: 30) на карбокси-окончании SEQ ID NO: 39 не включается в последовательность Fab.

Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи Fab 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGT  
 ATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCC  
 GGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGCGGCACCATTAATTACGCCCAGA  
 AATTTACAGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTC  
 CTCACCTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGAGTCGATGGGACCCTCTTTAC  
 TATATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTATCTGCTAGCACAAAAG  
 GACCATCAGTCTTCCCACTTGCCTTTCATCTAAGAGCACAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGG  
 CTGCCTGGTGAAAGATATTTCCCCGAACCTGTACAGTTTCTTGGAACTCCGGTGCAGTACGACA

TCCGGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTCGGTGG  
 TCACTGTTCCATCGTTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTC  
 CAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACACA (SEQ ID  
 NO: 40)

030 могут также быть получены в качестве последовательности полипептидов тяжелой цепи Fab IgG2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTIN  
 YAQKFGQRVTTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGTIVTVSSA  
 STKGPSVFPFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERK (SEQ ID NO: 54)

Пример 13. Экспрессирование и очистка вариантов фрагментов Fab.

Вставки в домен VH, содержащие следующие мутантные сочетания, A28V/I51T/S55G, S30P/I51T/S55G и A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030), генерируются из векторов дрожжевых дисплеек посредством двойного переваривания с помощью BamHI-HF/NheI-HF. Вставки очищаются с помощью электрофореза на 1% агарозном геле и лигируются в вектор экспрессии млекопитающих, полученный из pTT5, содержащий лидерную последовательность, домен IgG1 CH1 человека и C-конечную His-метку. Трансформанты выбираются с помощью селекции на LB-Amp, обрабатываются с помощью MiniPrep и вставки подтверждаются посредством секвенирования. Транзистентные трансфицирования осуществляют в клетках HEK-6E (Canadian Research Council) для каждой тяжелой цепи мутантной Fab, спаренной с легкой цепью EBI-029 дикого типа (описывается в настоящем документе как SEQ ID NO: 12) с использованием PEI в качестве трансфицирующего реагента. Fab EBI-029 дикого типа также экспрессируется в качестве контроля (тяжелая цепь Fab дикого типа описывается в настоящем документе как SEQ ID NO: 24). Супернатанты собирают через 5 дней и экспрессированные Fab очищают с помощью афинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы (Life Technologies). Для очищенного белка осуществляют замену буфера в PBS, pH 7,4, посредством нескольких заходов концентрирования/разбавления и концентрирование и чистоту белка определяют с помощью Absorbance 280 и SDS-PAGE.

Пример 14. Варианты антител показывают улучшенное связывание согласно оценкам с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

Сродство вариантов молекул Fab 029 по отношению к IL-6 измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на спектрометре Reichert SR7000Dc. IL-6 человека при 20 мкг/мл в 10 мМ растворе ацетата натрия, pH 4,5, иммобилизуют на 500 кДа карбоксиметилдекстрановом чипе посредством стандартного аминокислотного связывания. Последовательные разбавления каждой молекулы Fab в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,3 инжестируют при 25°C при скорости потока 25 мкл/мин. Через 4 мин загрузку прекращают и измеряют диссоциацию посредством протекания проточного буфера (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,3) в течение 5 мин. Сенсограмма плохо подгоняется к модели связывания 1:1, возможно, из-за присутствия множества ориентаций IL-6 на чипе или из-за неспецифического связывания антитела. Вместо этого кривые подгоняются по подгонке с 2 видами (виды с низким сродством и высоким сродством, отмеченные как "низкое сродство" и "высокое сродство" в табл. 3) с использованием программного обеспечения TraceDrawer, где ka1, kd1 и KD1 представляют собой скорость ассоциации, скорость диссоциации и равновесную постоянную связывания для видов с низким сродством, и ka2, kd2 и KD2 представляют собой скорость ассоциации, скорость диссоциации и равновесную постоянную связывания для видов с высоким сродством. Все мутантные Fab имеют значительно более медленную диссоциацию по сравнению с Fab EBI-029 WT со следующим расположением по порядку величины от самого высокого до самого низкого сродства - A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > (EBI-029) WT.

Таблица 3

Результаты SPR для мутантных антител

Fab	ka1 (*e <sup>4</sup> )	kd1 (*e <sup>-4</sup> )	KD1 (нМ)	ka2 (*e <sup>5</sup> )	kd2 (*e <sup>-4</sup> )	KD2 (нМ)
WT	5,48	6,08	11,1	2,94	4,27	1,45
A28V/I51T/S55G	8,06	2,91	3,6	3,65	1,45	0,40
S30P/I51T/S55G	7,18	2,18	3,04	3,29	0,95	0,29
A28V/S30P/I51T/S55G	7,95	2,70	3,39	3,25	0,66	0,20
	Низкое сродство			Высокое сродство		

Пример 15. Варианты антител показывают улучшенную антагонистическую эффективность в репортерных клетках HEK-Blue™ IL-6.

Линия репортерных клеток HEK-Blue™ IL-6 (Invivogen) используется для сравнения эффективности ингибирования передачи сигналов IL-6 между различными мутантными фрагментами Fab EBI-029. Клетки HEK-Blue™ IL-6 представляют собой модифицированную линию HEK293, стабильно экспрессирующую ген IL-6R и содержащую секретлируемый репортерный ген щелочной фосфатазы под контролем минимального промотора IFN $\beta$ , слитого с четырьмя сайтами связывания STAT3. Для измерения антагонизма к IL-6 10 мкл 400 пМ IL-6 человека (R&D Systems 206-IL-010/CF) смешивают с 10 мкл каждого варианта Fab в некотором диапазоне концентраций в 96-луночной планшете и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки HEK-Blue™ IL-6 в логарифмической фазе трипсинизируются и повторно суспендируются в среде для анализов (DMEM, 4,5 г/л глюкоза, 10% термически дезактивированного FBS, 2 mM L-глутамина, Пен-Стреп) при 280000 клеток/мл. 180 мкл суспензии клеток добавляют в каждую лунку смесей IL-6/Fab для доведения конечной концентрации IL-6 до 20 пМ. Клетки инкубируют при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение 20 ч. Затем 20 мкл супернатанта из каждой лунки смешивают с 180 мкл реагента Quanti-Blue™ (Invivogen) и инкубируют при 37°C в течение 40 мин перед измерением коэффициента поглощения на 650 нм на спектрофотометре для прочтения планшетов SpectraMax M5. Фоновый сигнал от лунок без IL-6 вычитают, а затем производят деление на сигнал от клеток, обработанных IL-6 без ингибитора, для получения относительной величины передачи сигналов. Все мутанты показывают значительно более низкую эффективность по сравнению с Fab EBI-029 WT, при этом расположение по порядку антагонистической эффективности является следующим: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > (EBI-029) WT. Эти результаты показаны на фиг. 6.

Пример 16. Варианты антител показывают улучшенную антагонистическую эффективность при анализе пролиферации T1165.

Клетки T1165.85.2.1 (R&D Systems) представляют собой линию клеток плазмцитомы мышинных, которые пролиферируют в ответ на IL-6 мыши, крысы или человека. Для измерения антагонизма от мутантов Fab EBI-029 25 мкл 2 нг/мл IL-6 человека (R&D Systems 206-IL-010/CF) смешивают с 25 мкл каждого варианта Fab в некотором диапазоне концентраций в 96-луночной планшете и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки T1165 в логарифмической фазе гранулируют и повторно суспендируют в среде для анализа (90% RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-глутамина, Пен-Стреп) при 2×10<sup>5</sup> клеток/мл. 50 мкл суспензии клеток добавляют в каждую лунку смесей IL-6/Fab для доведения конечной концентрации IL-6 до 0,5 нг/мл. Клетки инкубируются при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. 100 мкл реагента Cell-Titer Glo® (Promega) добавляют в каждую лунку и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин. Люминесценцию измеряют на спектрофотометре для прочтения планшетов SpectraMax M5. Все мутанты показывают значительно более высокую эффективность по сравнению с Fab EBI-029 WT без какой-либо измеримой передачи сигналов IL-6 во всем диапазоне исследуемых концентраций Fab (см. фиг. 7).

Пример 17. Сравнение сходных свойств лекарственных средств вариантов антител.

Термическую стабильность каждого варианта Fab определяют с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). 2 мкл белка при концентрации 2,5 или 5 мг/мл смешивают с 18 мкл PBS и 2 мкл 50× Sypro Orange в 96-луночной планшете для PCR BioRad. Планшет помещают в BioRad CFX96 RT-PCR System с линейным повышением температуры от 25°C и 95°C, и измеряют флуоресценцию как функцию времени. T<sub>m</sub> вычисляется как самая низкая точка первой производной кривой плавления. Все варианты имеют измеренные значения T<sub>m</sub> в пределах между 76 и 78°C, что согласуется с измеренной T<sub>m</sub> Fab EBI-029 WT при 76°C.

Для измерения агрегации образцы оценивают с помощью SEC-MALS с использованием ВЭЖХ Agilent 1260, объединенной с инструментом для измерения рассеяния света Wyatt miniDawn TREOS и инструментом для измерения коэффициента преломления Wyatt Optilab rEX. Инъектируют 20-100 мкг белка и исследуют его при скорости потока 1 мл/мин. Все варианты имеют молекулярную массу в пределах между 45000 и 52000 Да, как измерено с помощью рассеяния света, что согласуется с Fab EBI-029 дикого типа.

Эти результаты показывают, что EBI-030 тоже ведет себя хорошо по сравнению с EBI-029, с точки зрения свойств, подобных лекарственным средствам.

Пример 18. Продуцирование антител IqG2 EBI-029 и EBI-030 полной длины и антител IqG2 с мутантными доменами Fc.

Переформатирование EBI-029 и EBI-030 до IgG2 и IqG2 с мутантными Fc.

Вариабельные домены тяжелых цепей EBI-029 и EBI-030, содержащие лидерную последовательность (MDWTWRILFLVAAATGAHS; SEQ ID NO: 49), амплифицируются с помощью PCR из векторов Fab с использованием праймеров, которые вводят N-конечный сайт EcoRI и C-конечный сайт NheI. Продукты PCR очищаются на 1% агарозном геле и подвергаются воздействию двойного переваривания с помощью EcoRI-HF и NheI-HF. Векторы основных цепей на основе pTT5, содержащие последовательность тяжелой цепи IgG2 дикого типа или вариант домена IgG2 с мутацией H311A (H311 соответствует нумерации SEQ ID NO: 41; это соответствует H310 в нумерации, предлагаемой в Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)) подобным же образом, перевариваются EcoRI-HF/NheI-HF и очищаются на 1%

агарозном геле. Вставки лигируются в переваренную основную цепь с использованием фермента Quikligase (New England Biolabs), трансформируются в клетки TOP10 (Life Technologies) и подвергаются селекции на LB-Amp. Клоны обрабатываются с помощью MiniPrep и секвенируются для подтверждения вставок. Выбирают мутацию H311A для уменьшения сродства связывания Fc по отношению к FcRn для уменьшения системной аккумуляции молекул, которые утекают из ткани глаза.

Экспрессирование и очистка вариантов IgG2 с помощью транзientного трансфицирования IgG2 EBI-029, IgG2 EBI-029-H311A, IgG2 EBI-030 и EBI-030 IgG2-H311A экспрессируются посредством транзientного трансфицирования в клетках НЕК-6Е. Векторы рТТ5, содержащие, каждый, тяжелую цепь, совместно трансфицируются плазмидом LC EBI-029 с использованием PEI в качестве реагента трансфицирования. Супернатанты собирают через 5 дней, и экспрессируемые молекулы IgG2 очищают с помощью афинной хроматографии с использованием агарозы с белком А. Для очищенного белка осуществляют замену буфера в PBS, pH 7,4 с помощью нескольких заходов концентрирования/разбавления и концентрации и чистоту белка определяют с помощью Absorbance 280 и SDS-PAGE.

Продуцирование стабильного пула CHO.

Стабильные пулы CHO, продуцирующие IgG2 EBI-029, IgG2 EBI-030 или IgG2-H311A EBI-030, генерируют с использованием набора Freedom CHO-S (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, каждую тяжелую цепь клонируют посредством стандартного переваривания/лигирования в вектор рCHO 1.0 в сочетании с EBI-029 LC. Конструкты трансфицируют в клетки CHO-S с использованием реагента Freestyle MAX, и стабильные пулы выбирают с помощью селекции при увеличении концентраций Puromycin и MTX. После двух заходов селекции пулы просматривают на продуцирование антитела с помощью аналитической хроматографии на белке А, и пулы с наивысшей производительностью выбирают для масштабирования и субклонирования.

Последовательности представлены ниже.

Последовательность полипептидов тяжелой цепи 030 (в каркасе IgG2, CDR подчеркнуты):

QQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TFPGGTTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT  
 QTYTCNVNDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEV TCVVVDVSH EPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
 FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY  
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD  
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID  
 NO: 41)

Последовательность полипептидов легкой цепи 030 (в каркасе IgG2, CDR подчеркнуты):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMN WYQQKPGQPPK L  
 LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTITIS SLQAEDVAVY YCQOSEEVPL  
 TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV  
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 42)

Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGT  
 ATCTTGTAAAGCGTCTGGTTACGTCCCTTCCAAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCC  
 GGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGCGGCACCATTAATTACGCCCAGA  
 AATTTCAAGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTC  
 CTCACCTCCGAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGAGTCGATGGGACCCCTTTTAC  
 TATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGG  
 GCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG  
 CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACC  
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
 TGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAG  
 CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCAGCA  
 CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCT  
 CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTC  
 AACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG  
 AGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC  
 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG  
 AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGTGGACTCCGACGGCTC  
 CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTA AA SEQ ID NO:43

Последовательность нуклеиновых кислот легкой цепи 030:

GACATAGTGATGACTCAAAGTCCGGACAGCCTGGCGGTGTCACTCGGCGAACGGGCAAC  
 TATCAACTGCCGAGCCAGCGAGAGCGTCGATAATTACGGCATCCCCTTCATGAACTGGTATCAG  
 CAGAAGCCAGGACAGCCGCCAAGGTGCTTATCTACGCCGCTTCCAACCGGGGATCAGGGGTGC  
 CCGATCGATTTAGTGGAAAGCGGTAGTGGGACCGATTTACACTGACCATCAGCTCCCTTCAGGC  
 CGAGGATGTGGCTGTCTATTATTGTGTCAGCAATCCGAGGAAGTGCCGCTCACGTTTGGTCAAGGA  
 ACCAAACTGGAGATCAAGCGGACCGTAGCGGCGCCTAGTGTCTTCATCTTCCACCCCTCCGACG  
 AACAGCTGAAGTCTGGCACTGCTTCCGTGCTGTGCTCAACAACCTTTTACCCTAGAGAGGC  
 AAAAGTTCAATGAAAAGTAGACAATGCCTTGCACTCCGGGAACCTCCAGGAGTCTGTACAGAG  
 CAGGATAGTAAGGACTCAACCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACCCCTCTCCAAAGCCGACTACG  
 AGAAGCACAAAAGTGTACGCTTGCAGAGTTACGCATCAGGGGCTGTCTCACCCGTTACAAAAAG  
 TTTTAAACAGAGGGGAGTGCSEQ ID NO:44

Последовательность полипептидов тяжелой цепи с мутацией H311A (311A выделена жирным шрифтом и CDR подчеркнуты), также упоминаемая в настоящем документе как последовательность полипептидов тяжелой цепи 031:

QVQLVQSGAE	VKPKGSSVKV	SKKASGYVLP	NYLIEWVRQA	PGQGLEWMGV
<u>TPGGGTINY</u>	AQKFQGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARSR
<u>WDPLYYYALE</u>	YWGQGTIVTV	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL
VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSSV	VTVPSNFGT
QTYTCNVDPK	PSNTKVDKTV	ERKCCVECPP	CPAPPVAGPS	VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST
FRVSVLTVV	<b>AQD</b> WLNKEY	KCKVSNKGLP	APIEKTISK	KGQPREPQVY
TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPMLD
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK (SEQ ID
NO:47)				

## Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи 031:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGT  
 ATCTTGTAAAGCGTCTGGTTACGTCTTCCAAACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCC  
 GGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGCGGCACCATTAATTACGCCCAGA  
 AATTTAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTC  
 CTCACTCCGCGAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCCTTTTAC  
 TATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACCAAGG  
 GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG  
 CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACC  
 AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
 TGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAG  
 CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCA  
 CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCT  
 CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTC  
 AACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGGCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG  
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC  
 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG  
 AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTC  
 CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTAAA (SEQ ID NO:48)

**Пример 19. Сравнение эффективности IgG2 EBI-029 и EBI-030 при анализе с использованием НЕК-Blue-IL-6.**

Линия репортерных клеток НЕК-Blue™ IL-6 (Invivogen) используется для сравнения эффективности ингибирования передачи сигналов IL-6 для антител IgG2 EBI-029 и EBI-030. Сравнивают три препарата белков, очищенных из клеток НЕК-6Е - IgG2 EBI-029, IgG2 EBI-030 и IgG2-H311A EBI-030 (также упоминаемые как 031 или EBI-031), вместе с препаратом IgG2 EBI-030, продуцируемого в стабильном пуле CHO. В дополнение к этому тоцилизумаб, одобренное антитело анти-IL-6R, включается в качестве контроля. Для измерения антагонизма к IL-6 IL-6 человека (R&D Systems 206-IL-010/CF) при концентрации 400 пМ смешивают с различными концентрациями каждого антитела в 96-луночном планшете и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки НЕК-Blue™ IL-6 в логарифмической фазе трипсинизируются и повторно суспендируются в среде для анализов (DMEM, 4,5 г/л глюкоза, 10% термически дезактивированного FBS, 2 mM L-глутамин, Пен-Стреп) при 280000 клеток/мл. Добавляют 180 мкл суспензии клеток в каждую лунку смесей IL-6/Fab для доведения конечной концентрации IL-6 до 20 пМ. Клетки инкубируют при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение 20 ч. Затем 20 мкл супернатанта из каждой лунки смешивают с 180 мкл реагента Quanti-Blue™ (Invivogen) и инкубируют при 37°C в течение 40 мин перед измерением коэффициента поглощения на 650 нм на спектрофотометре для прочтения планшетов SpectraMax M5.

Результаты показаны на фиг. 8 и в табл. 5. EBI-030 (включая EBI-030, продуцируемые в клетках НЕК с мутацией H311A или без нее, и EBI-030, продуцируемые в клетках CHO) показывают сильное увеличение эффективности (примерно 50-кратное уменьшение IC<sub>50</sub> и >100-кратное уменьшение IC<sub>90</sub>) по сравнению с EBI-029. Увеличение эффективности больше чем увеличение сродства, измеренное с помощью SPR.

Таблица 5

Значения IC <sub>50</sub> и IC <sub>90</sub>		
	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)
ЕВІ-029	47	4350
ЕВІ-030	0,9	1,1
ЕВІ-030 СНО	1,4	11
ЕВІ-030-Н311А	0,6	12,4
Тоцилизумаб	1490	23700

ЕВІ-031 (упоминаемый также в настоящем документе как IgG2-Н311А ЕВІ-030) имеет IC<sub>50</sub> более чем в 75 раз меньше, чем у ЕВІ-029, и IC<sub>90</sub> примерно в 350 раз меньше, чем у ЕВІ-029. ЕВІ-030, продуцируемые в клетках НЕК, имеют IC<sub>50</sub> более чем в 50 раз меньше чем у ЕВІ-029, и IC<sub>90</sub> приблизительно в 4000 раз меньше чем у ЕВІ-029.

Пример 20. Анализ моделирования влияния увеличения эффективности на продолжительность блокады ІІ-6 в стекловидном теле.

Воздействие увеличения эффективности на степень и продолжительность блокады ІІ-6 после введения в стекловидное тело моделируют с использованием фармакокинетической модели (фиг. 9). Дифференциальные уравнения, описывающие изменения концентрации свободного антитела (А), свободного ІІ-6 (ІІ), и комплекса антитело/ІІ-6 (АІІ), определяются следующим образом:

$$d/dt(A) = -A \cdot k_{ae} - A \cdot ІІ \cdot k_1 + АІІ \cdot k_2$$

$$d/dt(ІІ) = k_{pi} - ІІ \cdot k_{ie} - A \cdot ІІ \cdot k_1 + АІІ \cdot k_2$$

$$d/dt(АІІ) = -АІІ \cdot k_{aie} + A \cdot ІІ \cdot k_1 - АІІ \cdot k_2$$

где  $k_{ae}$  представляет собой скорость выведения свободного антитела из стекловидного тела,  $k_1$  представляет собой скорость ассоциации для связывания антитело/ІІ-6,  $k_2$  представляет собой скорость диссоциации комплекса антитело/ІІ-6,  $k_{pi}$  представляет собой скорость продуцирования ІІ-6,  $k_{ie}$  представляет собой скорость выведения свободного ІІ-6 из стекловидного тела и  $k_{aie}$  представляет собой скорость выведения комплекса антитело/ІІ-6 из стекловидного тела. Исходные значения параметров и скорости определяются, как показано в табл. 6.

Таблица 6

Исходные значения параметров и скорости	
Параметр	Величина
Начальная концентрация антитела - $A_0$	3000 нМ
Начальная концентрация ІІ-6 - $ІІ_0$	0,01 нМ
Начальная концентрация комплекса - $АІІ_0$	0
Скорость ассоциации - $k_1$	8,64 нМ <sup>-1</sup> день <sup>-1</sup>
Скорость диссоциации - $k_2$	Изменяется от 0,0086 день <sup>-1</sup> до 0,86 день <sup>-1</sup>
Скорость выведения антитела - $k_{ae}$	0,037 день <sup>-1</sup>
Скорость выведения ІІ6 - $k_{ie}$	0,69 день <sup>-1</sup>
Скорость продуцирования ІІ6 - $k_{pi}$	0,0069 нМ день <sup>-1</sup>
Скорость выведения комплекса - $k_{aie}$	0,037 день <sup>-1</sup>

$A_0$  вычисляют на основании предположений относительно 50-мкл дозы 50 мг/мл антитела в глазу человека при объеме стекловидного тела 5 мл.

$ІІ_0$  оценивают на основе клинически измеренных величин для ІІ-6 в стекловидном теле у пациентов с DME ~200 пг/мл.

$k_1$  оценивают на основе типичных скоростей ассоциации антител  $1E5 M^{-1}c^{-1}$ , при этом  $k_2$  изменяет-

ся для моделирования величины эффективности в пределах от 100 до 1 пМ.

кае получают из измеренных времен полувыведения из стекловидного тела у кролика ~11 дней, масштабируемого в 1,8 раза, как измерено ранее для РК человека.

kie оценивают при времени полувыведения 24 ч и

kpi вычисляют как  $IL_0 \times kie$ .

Моделирование свободного антитела и свободного IL-6 осуществляют с использованием программного обеспечения Berkeley Madonna в течение времени 300 дней (фиг. 10). Порог 95% для блокады IL-6 выбирают для измерения продолжительности ингибирования. Модель предсказывает, что увеличение эффективности антитела значительно увеличивает продолжительность ингибирования IL-6 в глазу от 130 дней для  $k_2/k_1 = 100$  пМ до 200 дней для  $k_2/k_1 = 10$  пМ и до 225 дней для  $k_2/k_1 = 1$  пМ.

Пример 21. Фармакокинетика IL-6а.

Фармакокинетические (РК) эксперименты осуществляют на самцах новозеландских белых кроликов от PharmOptima (Portage, MI). Все животные имеют возраст 12-13 месяцев и массу 2,61-3,42 кг. Сравнивают следующие белки: EBI-029-IgG2 (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12), EBI-029-IgG2-H311A (SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12), EBI-030 (SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42), EBI-030-IgG2-H311A (SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 42), EBI-029 Fab (SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 12), Eylea® (ловушка VEGF) и тоцилизумаб (TCZ; антитело анти-IL-6R). Все белки приготавливают при 13,8 мг/мл в PBS, pH 7,4. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, EBI-029 Fab и тоцилизумаб не связываются с их целевыми антигенами у кролика, в то время как Eylea® связывается с VEGF кролика.

Для исследования РК в стекловидном теле 9 животным делают инъекцию из 50 мкл исследуемого изделия в каждый глаз. Перед инъекцией на поверхность глаза наносят лидокаин гидрохлорид (2% для инъекции), 0,5% проксиметакаина или 0,5% тетракаина. Инъекции осуществляют в среднюю часть стекловидного тела с помощью BD 300-мкл шприца для инсулина (31G×5/16-дюймовая игла) вставляемого через дорсотемпоральный квадрант глаза. Для исследования системной РК 3 животным делают инъекцию 100 мкл исследуемого изделия через ушную вену.

Последовательные образцы крови собирают у 3 животных в группах как с IVT, так и с iv (внутривенным введением) через 0,083, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 и 336 ч и разбавляют 1:1 цитратно-фосфатно-декстрозным раствором и помещают на лед. Плазму собирают посредством центрифугирования охлажденных образцов крови при 4000 об/мин в течение 10 мин при 4°C и хранят ее замороженной при -80°C.

Ткани глаза собирают из обоих глаз у всех животных в группе IVT через 0,25, 24, 168 и 336 ч после дозирования. Животных умерщвляют посредством эвтаназии с помощью внутривенного передозирования барбитурата. Для отбора внутриглазной жидкости непосредственно после эвтаназии, вставляют шприц с иглой под роговицу и внутриглазную жидкость медленно выкачивают. Внутриглазную жидкость переносят в предварительно помеченную пробирку и помещают на сухой лед или замораживают при -80°C. Для отбора жидкой части стекловидного тела маленький срез вводят в склеру извлеченного глаза с использованием скальпеля, и жидкая часть стекловидного тела выкачивается через отверстие с помощью шприца. Образец измеряют с помощью делений на шприце, переносят в предварительно помеченную пробирку и помещают на сухой лед или замораживают при -80°C.

Для отбора сетчатки и сосудистой оболочки глаза маленький срез вводится с помощью скальпеля в склеру извлеченного глаза параллельно и каудально радужной оболочке. Используют ножницы для продолжения отверстия вокруг глазного яблока глаза, разделяя его на две половинки. Заднюю часть глазного яблока располагают таким образом, что внутренняя часть направлена вверх. С использованием ребристого ножа, сетчатку осторожно выбирают из глазного яблока. После сбора сетчатки из глазного яблока сосудистую оболочку глаза выбирают сходным образом из оставшейся части глазного яблока. Оба образца, отдельно, переносятся в предварительно взвешенные и предварительно помеченные пробирки Precellys®, взвешиваются и помещаются на сухой лед или замораживаются при -80°C. Ткани сетчатки и сосудистой оболочки глаза разбавляют десятикратно в фосфатном буферном солевом растворе (PBS), гомогенизируют и хранят при -80°C.

Концентрации белка в каждой ткани оцениваются с помощью ELISA. Для EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A и Fab EBI-029, планшеты половинного объема Costar покрывают раствором 1 мкг/мл IL-6 человека в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки блокируют PBS, содержащим 2% BSA, промывают, а затем инкубируют с помощью ряда разбавлений для каждого образца, используя в качестве разбавителя PBS+5% плазмы кролика+0,05% Tween-20. Стандартную кривую с использованием очищенного белка также включают для каждого планшета. Образцы инкубируют при комнатной температуре в течение 60 мин, затем промывают три раза 300 мкл PBS, содержащего 0,05% Tween-20. Антитело анти-к-HRP (Genway Inc.), разбавленное 1:10000 в PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20, добавляют затем в каждую лунку и инкубируют в течение 30 мин. Лунки промывают, как выше, затем добавляют субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) и измеряют сигнал на 450 и 550 нм на спектрофотометре для прочтения планшетов Spectramax.

Концентрации белка вычисляют на основе стандартной кривой с использованием программного

обеспечения Softmax Pro 6. Каждый анализ ELISA повторяют по меньшей мере на 3 независимых планшетах и регистрируют среднее время полужизни.

Для тоцилизумаба концентрации белка определяют с помощью ELISA, как выше, за исключением того, что Fab антитоцилизумаб (BioRad HCA252) используют в качестве реагента захвата и антитело анти-IgG-Fc-HRP человека (Sigma A0170) используют в качестве детектирующего антитела. Два различных анализа ELISA используют для измерения свободного Eylea® и Eylea® в целом. Для свободного Eylea® лунки покрывают рекомбинантным VEGF (R&D Systems), и связанный белок детектируется с помощью антитела анти-IgG-Fc-HRP человека (Sigma A0170). Для измерения Eylea® в целом антитело анти-Fc человека (Sigma I2136) используют для захвата и антитело анти-IgG-CH2-HRP человека (BioRad MCA647P) используют для детектирования. Каждый анализ ELISA повторяют по меньшей мере на 3 независимых планшетах и регистрируют среднее время полужизни.

Сводка результатов.

У большинства животных наблюдается стойкое образование антител против белка, введенного посредством инъекции, оно наблюдается в моменты времени 240 и 336 ч. Поскольку это образование антител может влиять на выведение белков или оказывать влияние на ELISA, анализ данных ограничивается моментами времени до 168 ч и включая это время. Для РК в стекловидном теле все белки EBI-029 и EBI-030 IgG2 выводятся значительно медленнее ( $T_{1/2}$ =9,3, 9,0, 15,7 и 9,8 дня для EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030 и EBI-030-H311A соответственно) по сравнению с Eylea® ( $T_{1/2}$ =6,3 дня), тоцилизумабом ( $T_{1/2}$ =4,8 дня) или фрагментом Fab EBI-029 ( $T_{1/2}$ =3,9 дня) (фиг. 11, табл. 7). Сходные тенденции наблюдаются в сетчатке, сосудистой оболочке глаза и в глазной жидкости, где EBI-030 и EBI-030-H311A аккумулируются при более высоких уровнях по сравнению с Eylea® и тоцилизумабом (см. фиг. 12 и 13). Все белки являются детектируемыми в плазме после введения IVT EBI-029, EBI-030 и тоцилизумаба, они аккумулируются при значительно более высоких уровнях, чем Eylea® или EBI-030-H311A (см. фиг. 14). Подобным же образом, Eylea® и EBI-030-H311A выводятся быстрее из плазмы после IV введения, при этом время полужизни EBI-030-H311A составляет приблизительно половину от этого параметра для IgG2 дикого типа из-за уменьшения связывания FcRn (табл. 7).

Таблица 7

## Результаты фармакокинетики

РК в Стекловидном теле	
Молекула	$T_{1/2}$ (дни)
EBI-029	9,3
EBI-029-H311A	9,0
EBI-030	15,7
EBI-030-H311A	9,8
EBI-029 Fab	3,9
Eylea®	6,1 (свободный), 6,3 (в целом)
Тоцилизумаб	4,8
Системная РК после IV введения	
Молекула	$T_{1/2\beta}$ (часы)
EBI-029	77
EBI-030	69
EBI-030-H311A	33
Eylea®	37 (свободный), 42 (в целом)
ТСЗ	50

Пример 22. Растворимость EBI-031 при высоких концентрациях.

Очищенный EBI-031 концентрируют от 3 до 142 мг/мл в PBS, pH 7,4 с использованием центробежного концентратора Amicon Ultra-15. Препараты до и после концентрирования оцениваются относительно агрегации посредством анализа на колонке SEC (для эксклюзионной хроматографии) Tosoh G3000SWXL 7,8×30, объединенной с инструментом для измерения рассеяния света Wyatt miniDawn TREOS и с инструментом для измерения коэффициента преломления Wyatt Optilab rEX. 20 мкг белка инжектируется и исследуется при скорости потока 1 мл/мин в PBS. Массовая относительная величина для пика с ожидаемой молекулярной массой ~150 кДа приблизительно равна для двух концентраций (90,9% для 3 мг/мл и 91,3% для препарата 142 мг/мл), это показывает, что нет никакого значительного увеличения агрегации белка во время концентрирования. Эти результаты демонстрируют, что EBI-031 может концентрироваться до 142 мг/мл при небольшой измеряемой агрегации (агрегация <10%).

Пример 23. EBI-031 блокирует передачу сигналов цис- и транс- IL-6.

Линию репортерных клеток НЕК-Blue™ IL-6 (Invivogen) используют для сравнения эффективности EBI-031 и тоцилизумаба относительно блокирования передачи сигналов цис- и транс-IL-6. Для передачи сигналов, свободный цис-IL-6 (конечная концентрация=20 пМ) смешивается с EBI-031 или тоцилизумабом в некотором диапазоне концентраций в 96-луночном планшете и инкубируется при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки НЕК-Blue™ IL-6 в логарифмической фазе трипсинизируются и по-

вторно суспендируются в среде для анализов (DMEM, 4,5 г/л глюкоза, 10% термически дезактивированного FBS, 2 mM L-глутамин, Пен-Стреп), и 50000 клеток добавляют в каждую лунку при конечном объеме 200 мкл. Планшеты инкубируют при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение 20 ч. 50 мкл супернатанта из каждой лунки затем смешивают с 150 мкл реагента Quanti-Blue™ (Invivogen) и инкубируют при 37°C в течение 40 мин перед измерением коэффициента поглощения на 650 нм на спектрофотометре для прочтения планшетов SpectraMax M5. Фоновый сигнал от лунок без IL-6 вычитается, а затем делится на сигнал клеток, обработанных IL-6 без ингибитора для получения относительного значения передачи сигналов. EBI-031 (IC<sub>50</sub>=14,2 пМ) блокирует свободный IL-6 с эффективностью >900 раз большим, по сравнению с тоцилизумабом (IC<sub>50</sub>=12,9 нМ) (фиг. 16А).

Для измерения блокады транс-передачи сигналов осуществляются эксперименты, как выше, за исключением использования гипер IL-6 при конечной концентрации 200 пМ вместо свободного IL-6. Гипер IL-6 представляет собой продукт генетического слияния между IL-6 и растворимым рецептором IL-6 (Fischer et al., *Nature Biotechnology* 15:142-145 (1997)). EBI-031 блокирует гипер IL-6 с высоким эффективностью (IC<sub>50</sub>=32 пМ), в то время как тоцилизумаб не способен значительно ингибировать передачу сигналов без концентрации 1 мкМ (фиг. 16В).

Эти результаты показывают, что EBI-031 связывает IL-6 человека на сайте II или на сайте, который находится в контакте с gp130, при пМ средстве и блокирует передачу сигналов IL-6 и комплекса IL-6/sIL-6Rα при клеточных анализах в >900 раз сильнее, чем тоцилизумаб.

Пример 24. Компьютерное моделирование подавления передачи сигналов IL-6 с помощью EBI-031 внутри стекловидного тела.

Осуществляется компьютерное моделирование, как описано в примере 20, для предсказания продолжительности времени, в течение которого введение в стекловидное тело EBI-031 у людей должно подавлять 95% передачи сигналов IL-6. k<sub>2</sub> устанавливают при 0,12 в день 1, так что k<sub>2</sub>/k<sub>1</sub>=14 пМ, как измерено при анализе эффективности. T<sub>1/2</sub> выведения устанавливается при 18 дней на основе измеренного времени полувыведения из стекловидного тела кролика, масштабируемого в 1,8 раза для людей. Все другие параметры описаны в табл. 6. Модель предсказывает, что EBI-031 должны блокировать 95% передачи сигналов IL-6 в течение ~150 дней после введения в стекловидное тело (фиг. 17). Эти результаты моделирования показывают, что EBI-031 может в достаточной степени блокировать передачу сигналов IL-6 в глазу в течение продолжительного периода времени, например примерно до 6 месяцев.

Пример 25. Характеризация изоформ EBI-031.

EBI-031 представляет собой антитело IgG2. Как обсуждалось ранее, антитела IgG2 существуют в трех различных структурных изоформах, изоформах IgG2-A, IgG2-B и IgG2-A/B (фиг. 18). В этом примере осуществляют эксперименты для идентификации структурных изоформ в образцах EBI-031.

Анализ ВЭЖХ с обращенной фазой.

Высокоэффективный жидкостной хроматограф с обращенной фазой (ВЭЖХ с обращенной фазой) используют для разрешения различных структурных изоформ EBI-031. Улучшенный способ аналитической ВЭЖХ с обращенной фазой, который использовался ранее для разрешения структурных изоформ IgG2, опосредуемых дисульфидными связями (см., Dillon et al., *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120:112-120), оптимизируют для разрешения EBI-031.

Образцы EBI-031, содержащие приблизительно по 30 мкг, загружают в колонку Zorbax 300SB-C8 (150 мм × 2,1 мм, 5,0 мкм, 300 Å). Температуру колонки устанавливают при 75°C. Подвижная фаза А представляет собой воду, содержащую 0,1% TFA, а подвижная фаза В представляет собой 55% IPA, 40% ACN, 4,9% воды и 0,1% TFA. Скорость потока составляет 0,5 мл/мин. Колонку сначала уравнивают с помощью 90% подвижной фазы А и 10% подвижной фазы В в течение 2 мин, затем следуют ступенчатый градиент от 10 до 25% В в течение 2 мин. Элюирование осуществляют с линейным градиентом 25-32% В в течение 21 мин. УФ-поглощение отслеживают на 214 нм и/или 280 нм.

Для определения того, связано ли разрешение с дисульфидными мостиками, образцы обрабатывают 5 mM DTT и 10 mM цистеина при комнатной температуре в течение 2 мин, а затем анализируют с помощью метода ВЭЖХ с обращенной фазой (фиг. 19). Обработка DTT, который представляет собой сильнодействующий восстанавливающий агент, вызывает восстановление антитела IgG2, дающее в результате элюирование в ранних пиках (пик 0 и пик 1) (фиг. 19, средняя панель). Обработка цистеином, который представляет собой более мягкий восстанавливающий агент, по сравнению с DTT также сдвигает распределение изоформ в направлении ранних пиков (пик 0 и пик 1), хотя и не до такой степени, как видно для образца, обработанного DTT (фиг. 19, нижняя панель).

Данные демонстрируют, что метод ВЭЖХ с обращенной фазой разрешает структурные изоформы с различными дисульфидными связями. Структуры с различными дисульфидными связями подтверждаются посредством картирования невосстановленных пептидов и с помощью масс-спектрометрии: ранний элюирующийся пик (пик 1) содержит изоформу IgG2-A/B, а поздний элюирующийся пик (пик 2) содержит изоформу IgG2-A. Что важно, нет изоформы В IgG2-B (пик 0), детектируемой в образце EBI-031 (фиг. 19, верхняя панель).

Сравнение различных образцов EBI-031.

Используя анализ ВЭЖХ с обращенной фазой, описанный выше, анализируются образцы ЕВІ-031, собранные от различных линий клеток, экспрессирующих ЕВІ-031, для сравнения распределения изоформ продуцируемых антител. Образцы ЕВІ-031 собирают из культуры в масштабе 200 л клональной линии клеток, культуры в масштабе 10 л от родительской линии клеток и из стабильно трансфицированного пула клеток. ЕВІ-031 очищают с использованием трехстадийного хроматографического способа для линий клональных клеток и родительских линий клеток, экспрессирующих ЕВІ-031. ЕВІ-031 очищают из стабильно трансфицированного пула клеток, используя очистку на белке А. Образцы анализируются с помощью способов, описанных выше.

Результаты, показанные на фиг. 20, показывают, что все три образца ЕВІ-031 содержат изоформы IgG2-A и IgG2-A/B, но существенных количеств IgG2-B нет. Эти данные демонстрируют, что антитело IgG2 ЕВІ-031 продуцируется в менее гетерогенной смеси, чем другие антитела IgG2, происходит ли продуцирование в линии клональных клеток, экспрессирующих ЕВІ-031, в линии родительских клеток, экспрессирующих ЕВІ-031, или в гетерогенной популяции клеток, которые стабильно экспрессируют ЕВІ-031. Фиг. 21 показывает распределение изоформ для образца ЕВІ-031 из культуры в масштабе 200 л линии клональных клеток, экспрессирующих ЕВІ-031, т.е. это верхняя панель фиг. 20. Площади под кривыми также измеряются, и распределения между изоформами показаны в таблице под фигурой.

Пример 26. Фармакокинетика в исследованиях на приматах.

Фармакокинетика ЕВІ-031 исследуется в исследованиях на приматах. Исследуют двух самцов африканской зеленой мартышки. 50 мкл 50 мг/мл ЕВІ-031 вводят как инъекцию в стекловидное тело глаза. Для подгонки кривой используют программное обеспечение Madonna.

Данные от исследований на приматах моделируют с использованием подгоночной кривой. Дифференциальные уравнения, описывающие изменения концентрации антител в стекловидном теле (A) и антител вне стекловидного тела, например системной концентрации (Ap), определяются как следующим образом:

$$d/dt (A) = -A * k_{ae}$$

$$d/dt (A_p) = A * k_{ae} (Dil) - A_p * k_{ape}$$

Начальные значения параметров и скорости определяются, как показано в таблице ниже.

Таблица 8

Начальные значения параметров и скорости

Параметр	Величина
Dil - разбавление	100
k <sub>ae</sub> - скорость удаления из стекловидного тела	0,2
k <sub>ape</sub> - скорость системного удаления	1,4
Init A - начальная концентрация антитела в стекловидном теле	1000000
Init A <sub>p</sub> - начальная концентрация антитела вне стекловидного тела	0

Другие соображения, включенные для подгонки, включают как разбавление, так и константа скорости являются плавающими при подгонке. Начальное значение A поддерживается постоянным (2×50 мл при 50 мг/мл в 5-мл глазу). Результаты моделирования, как показано на фиг. 22А, 22В и 23, показывают, что постоянные скорости удаления из стекловидного тела дают время полужизни 4,6 и 5,7 дней, соответственно, для двух обезьян. Средняя постоянная скорости удаления из стекловидного тела, как вычислено, составляет 5,2 дня. Системное удаление моделируется как 1,1 дня и 0,63 дня (в среднем 0,85 дня). Эти результаты демонстрируют, что время полужизни ЕВІ-031 в стекловидном теле значительно больше, чем системное время полужизни у приматов.

Пример 27. Фармакокинетика ЕВІ-031.

Осуществляют другой фармакокинетический (ПК) эксперимент, где 50 мкл раствора 20 мг/мл ЕВІ-031 вводят в виде инъекции в стекловидное тело в глазах кроликов. Исследуемые моменты времени представляют собой 1, 3, 7 и 14 дней (например, 24, 72, 168 и 336 ч). Анализируют двух животных (четыре глаза) в каждый момент времени. Способы введения препарата ЕВІ-031, сбора ткани глаза и определения концентрации белка осуществляются, как описано в примере 21.

Результаты показаны на фиг. 24А-24І. При анализе концентрации белка в течение дней 1-14 в жидкой части стекловидного тела время полужизни ЕВІ-031, как определено, составляет 8,95 дня (фиг. 24А). Однако детектируется сильная реакция антитела в день 14, которая может повлиять на эти результаты. Анализируя концентрацию белка в течение дней 1-7 в жидкой части стекловидного тела, время полужизни ЕВІ-031, как определено, составляет 18,88 дня.

ЕВІ-031 детектируются также и в других отделениях глаза после инъекции в стекловидное тело. ЕВІ-031 проникает также во внутриглазную жидкость (фиг. 24В), сосудистую оболочку глаза (фиг. 24С), конъюнктиву (фиг. 24Б), роговицу (фиг. 24Е), ресничное тело (фиг. 24Е), хрусталик (фиг. 24С), сетчатку (фиг. 24Н) и склеру (фиг. 24І). Концентрация лекарственного средства в этих тканях на один-два порядка величины ниже, чем концентрации, детектируемые в стекловидном теле.

Другие варианты осуществления находятся в рамках следующей далее формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с IL-6 человека, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую:
  - (i) CDR1 VH, содержащую последовательность GYVLPNYLIE (SEQ ID NO: 31),
  - (ii) CDR2 VH, содержащую последовательность VTTPGGGTIN (SEQ ID NO: 32), и
  - (iii) CDR3 VH, содержащую последовательность SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO: 33),
 и варибельную область легкой цепи, содержащую:
  - (i) CDR1 VL, содержащую последовательность RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO: 34),
  - (ii) CDR2 VL, содержащую последовательность AASNRRGS (SEQ ID NO: 35),
  - (iii) CDR3 VL, содержащую последовательность QQSEEVPLT (SEQ ID NO: 36).
2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее:
  - (i) последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, или
  - (ii) последовательность варибельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 37.
3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:
  - (i) SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 54, или
  - (ii) последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 54.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:
  - (i) последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41, или
  - (ii) последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 41.
5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:
  - (i) последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, или
  - (ii) последовательность варибельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 38.
6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:
  - (i) последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42, или
  - (ii) последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 42.
7. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с IL-6 человека, содержащее
  - варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, и
  - варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38.
8. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с IL-6 человека, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41, и последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.
9. Выделенный Fab, который специфически связывается с IL-6 человека, содержащий
  - последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 54, и
  - последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.
10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, у которого
  - (i) IC<sub>50</sub> меньше чем 47 пМ (например, IC<sub>50</sub> меньше чем 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 пМ) и/или
  - (ii) IC<sub>90</sub> меньше чем 4350 пМ (например, IC<sub>90</sub> меньше чем 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 пМ).
11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое обладает улучшенным удержанием в глазу при введении в стекловидное тело.
12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4 или 8, содержащее мутацию H311A (нумерация как в SEQ ID NO: 41).
13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где указанная мутация уменьшает системную аккумуляцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с системной аккумуляцией антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который не содержит мутации.
14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где указанная мутация уменьшает системную аккумуляцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с системной аккумуляцией антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который не содержит мутации, где системную аккумуляцию оценивают после введения в стекловидное тело антитела или антигенсвязывающего фрагмента.
15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой изоформу IgG2-A или изоформу IgG2-A/B, но не изоформу IgG2-B.
16. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с IL-6 человека, содержащее
  - последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47, и

последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.

17. Композиция для лечения заболевания, ассоциированного с IL-6, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Композиция по п.17 для лечения глазного заболевания, характеризующего повышенным уровнем IL-6.

19. Композиция по п.17 для лечения диабетического макулярного отека (DME), диабетической ретинопатии, сухого глаза (например, болезни сухого глаза или синдрома сухого глаза), аллергического конъюнктивита, увеита, возрастной макулярной дистрофии (AMD), пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), регматогенной отслойки сетчатки (RRD), окклюзии вены сетчатки (RVO), нейромиелимита зрительного нерва (NMO), трансплантата роговицы, эрозии роговицы или механической травмы глаза.

20. Способ лечения заболевания, ассоциированного с IL-6, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против IL-6 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16, причем заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой глазное заболевание, характеризующее повышенным уровнем IL-6 в стекловидном теле.

21. Способ по п.20, в котором заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек (DME), диабетическую ретинопатию, аллергический конъюнктивит, увеит, сухой глаз (например, болезнь сухого глаза или синдром сухого глаза), возрастную макулярную дистрофию (AMD), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), регматогенную отслойку сетчатки (RRD), окклюзию вены сетчатки (RVO), нейромиелимит зрительного нерва (NMO), трансплантат роговицы, эрозию роговицы или механическую травму глаза.

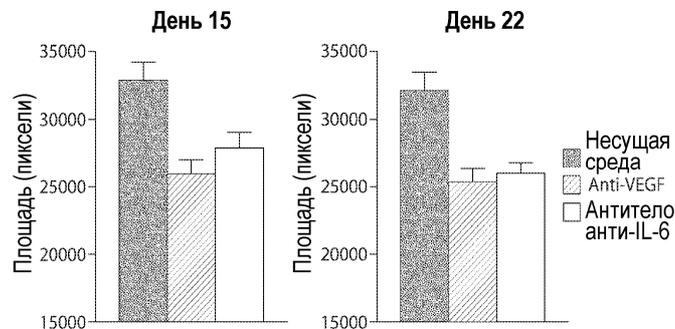
22. Способ по п.20, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент доставляют в стекловидное тело глаза субъекта.

23. Способ по любому из пп.20-22, в котором заболевание, ассоциированное с IL-6, представляет собой диабетический макулярный отек и антитело или его фрагмент доставляется в стекловидное тело глаза субъекта.

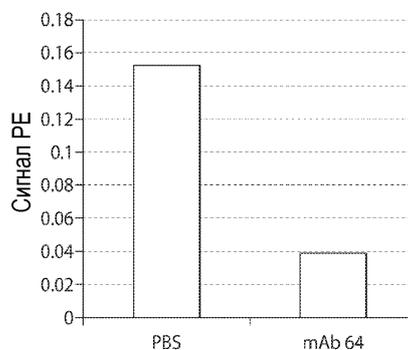
24. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16.

25. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.24.

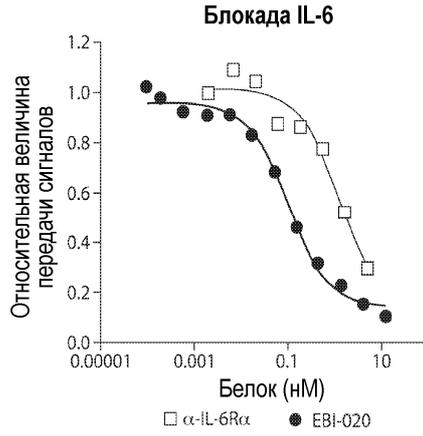
26. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.25.



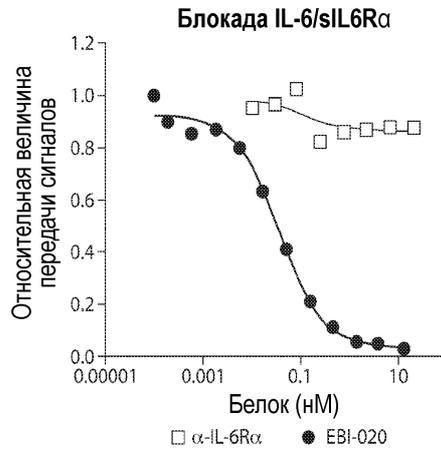
Фиг. 1



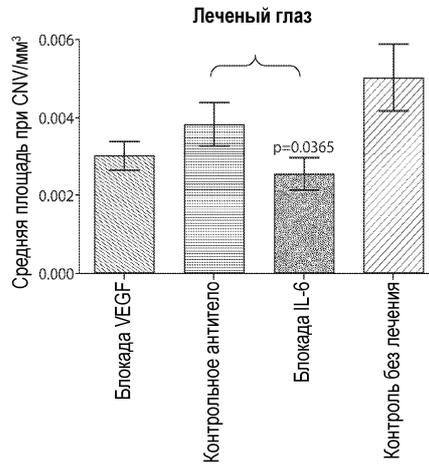
Фиг. 2



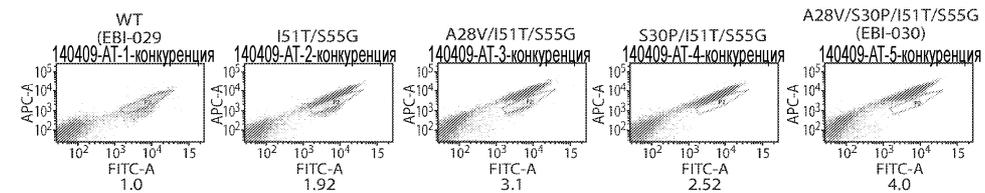
Фиг. 3А



Фиг. 3В

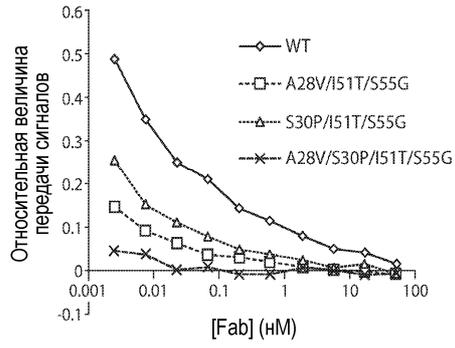


Фиг. 4

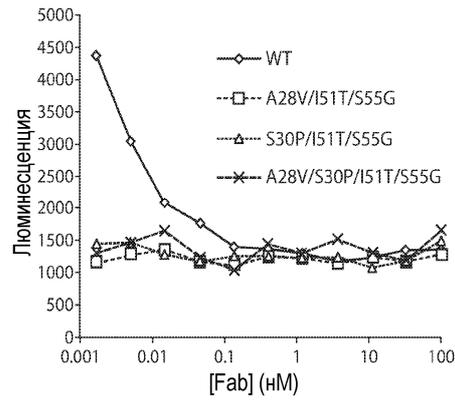


Кратность увеличения при связывании/диспее по сравнению с WT

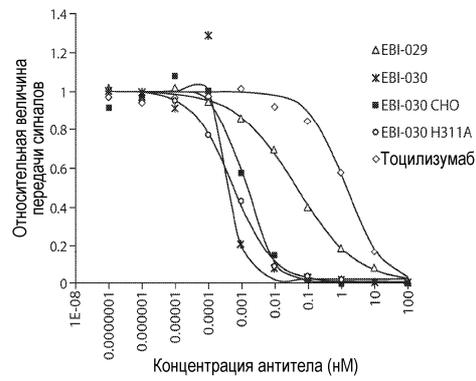
Фиг. 5



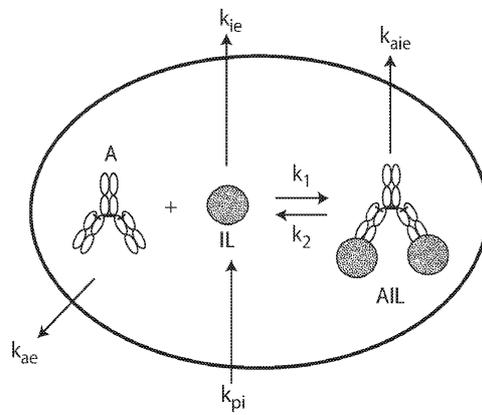
Фиг. 6



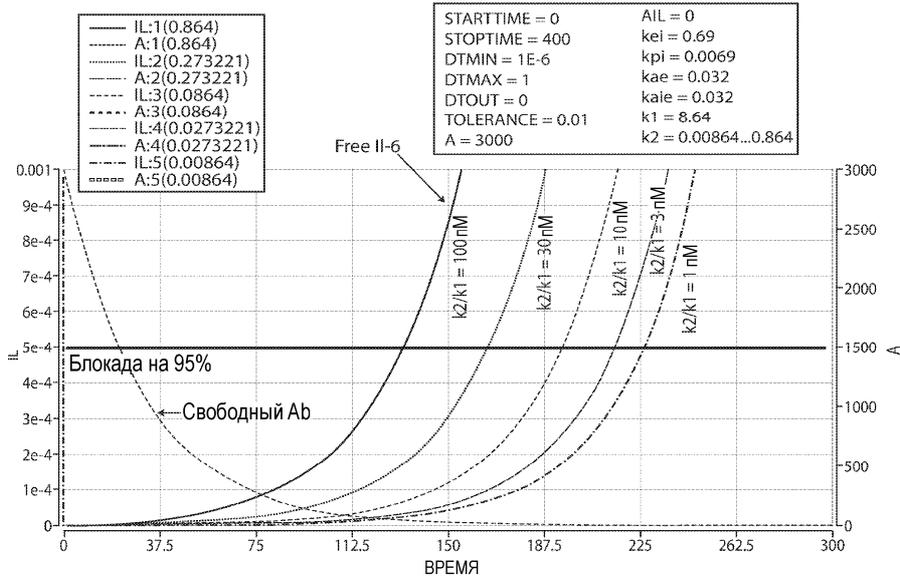
Фиг. 7



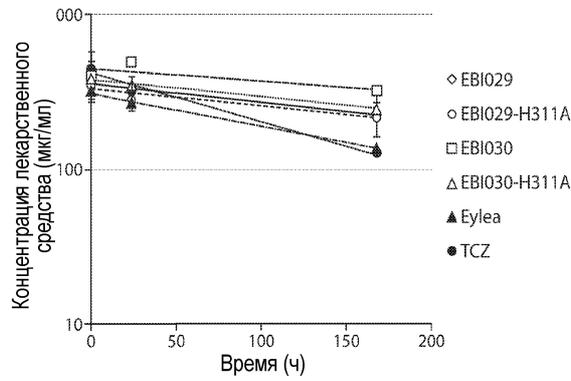
Фиг. 8



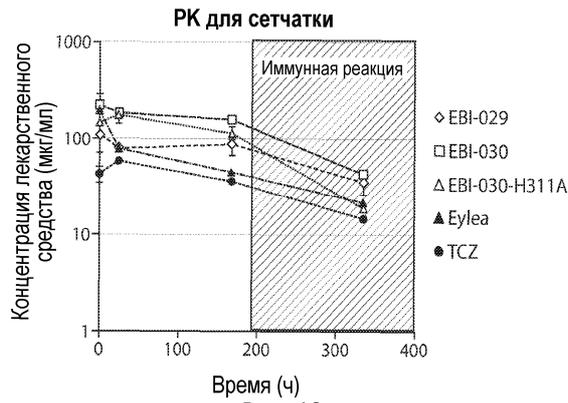
Фиг. 9



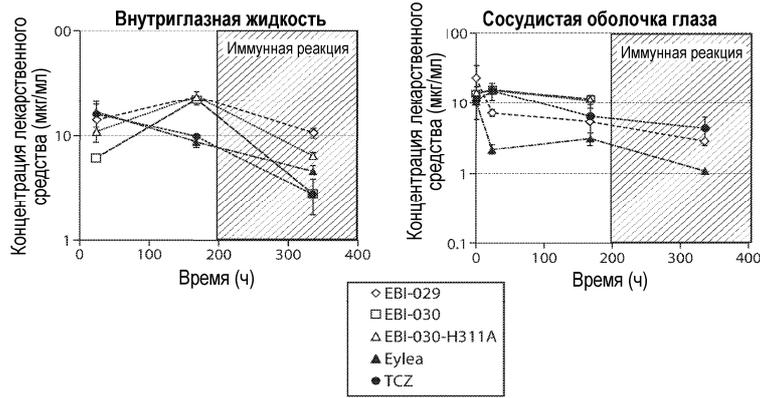
Фиг. 10



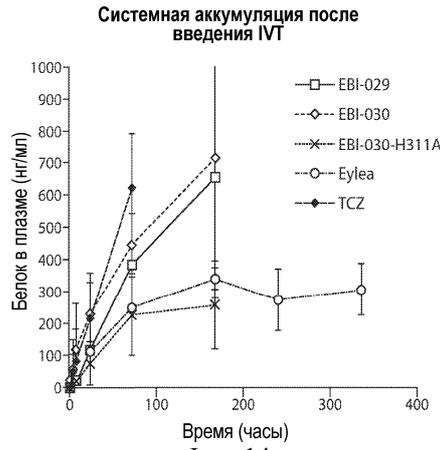
Фиг. 11



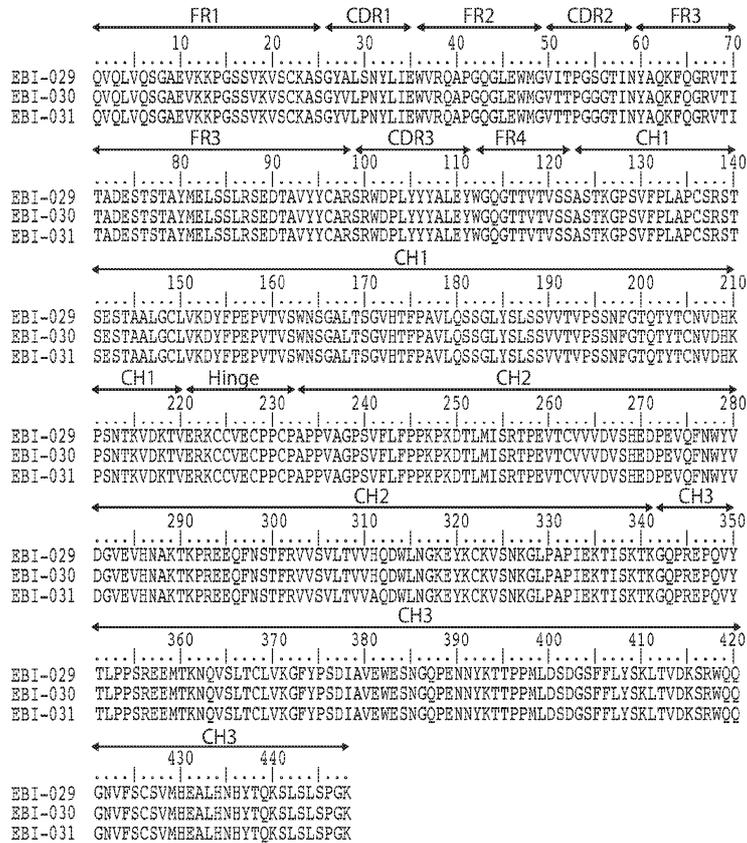
Фиг. 12



Фиг. 13

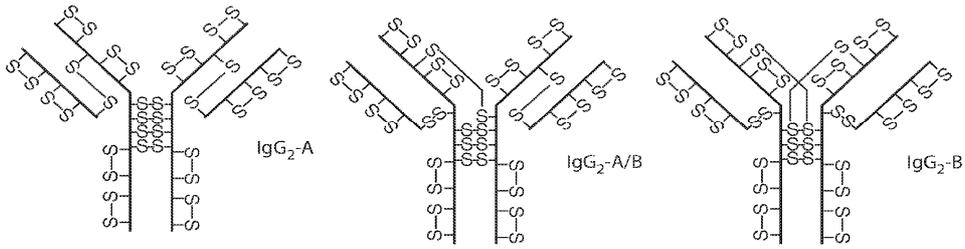


Фиг. 14

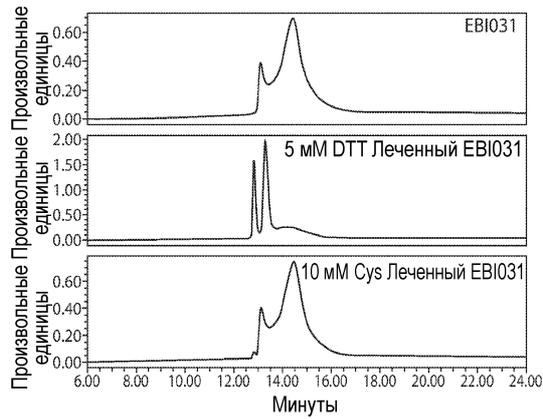


Фиг. 15A



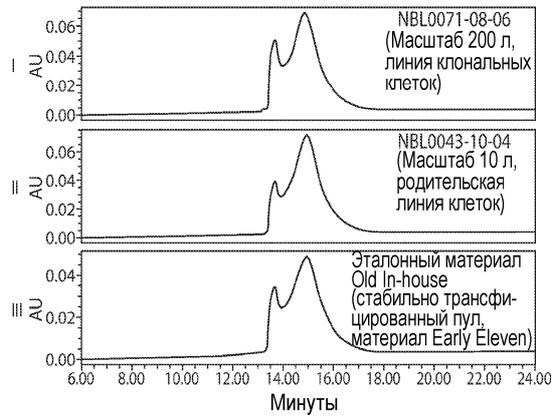


Фиг. 18



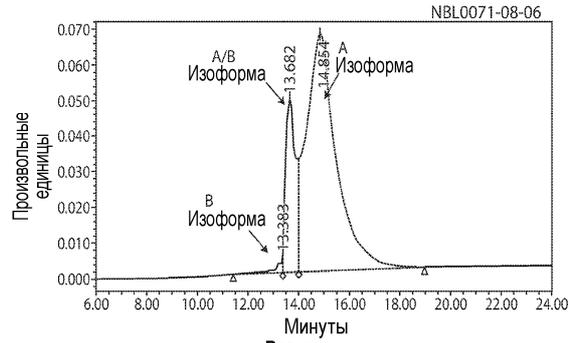
Фиг. 19

**ВЭЖ с обращенной фазой изоформ с дисульфидными связями - Сравнение образцов ЕБИ-031**



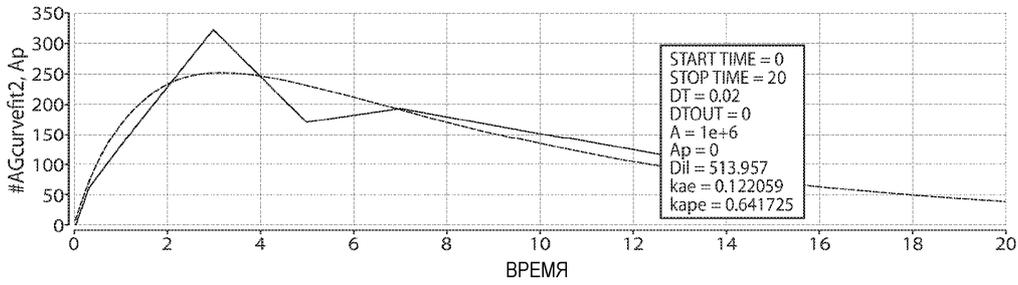
Фиг. 20

ЕВІ-031 (NBL0071-08-06, BDS из 200-л биореактора, клональная линия клеток) ВЭЖХ с обращенной фазой изоформ с дисульфидными связями

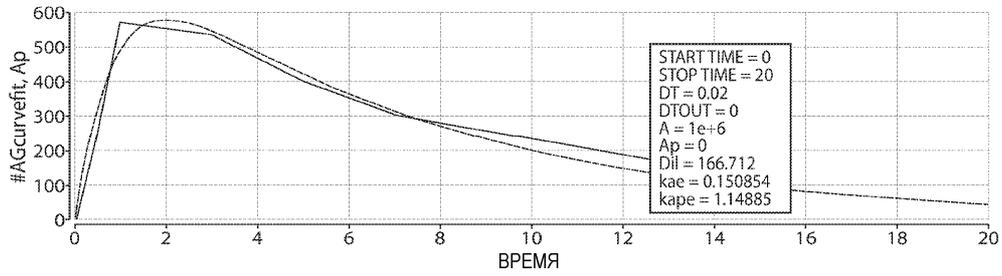


Наименование	Время удерживания	Площадь	% Площади
В Изоформа	13.383	58509	0.85
А/В Изоформа	13.682	1349980	19.67
А Изоформа	14.854	5453505	79.47

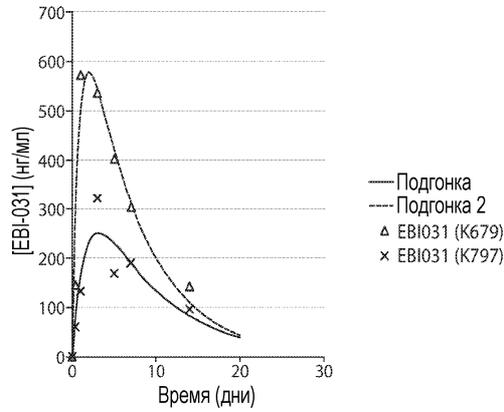
Фиг. 21



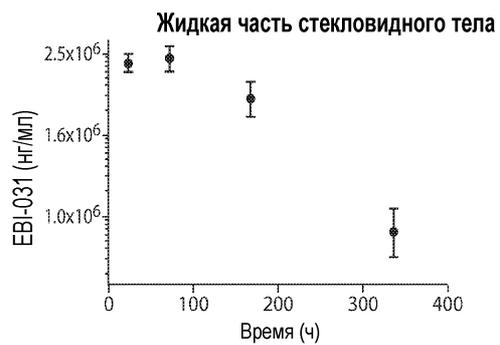
Фиг. 22А



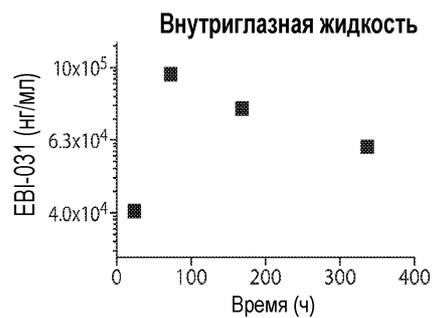
Фиг. 22В



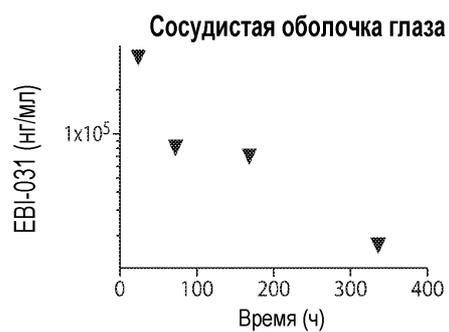
Фиг. 23



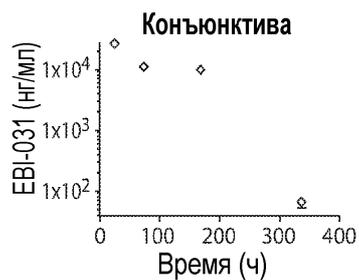
Фиг. 24А



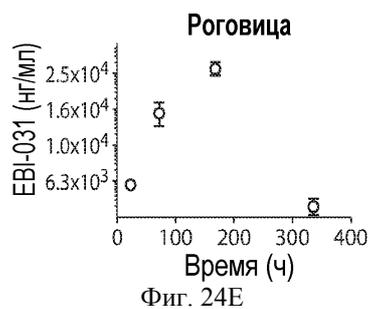
Фиг. 24В



Фиг. 24С



Фиг. 24D



Фиг. 24Е

